

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS



Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria obtenidos a partir de las hojas *Montanoa tomentosa*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Ciencias con Orientación en Química Orgánica

PRESENTA

Eric Jaziel Medrano Sánchez

DIRECTORES

Dr. Carlos Ernesto Lobato García - DACB

Dr. Manasés González Cortazar – CIBIS (IMSS)

Cunduacán, Tabasco.

Octubre 2020



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias
Básicas



2020
LEONORA VIGARISO

DIRECCIÓN

24 de agosto de 2020

Lic. Eric Jaziel Medrano Sánchez
Pasante de la Maestría en Ciencias
con Orientación en Química Orgánica
Presente

Por medio del presente y de la manera más cordial, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado **"Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria obtenidos a partir de las hojas de *Montanoa tomentosa*"** en virtud de que reúne los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Química Orgánica.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Gerardo Delgadillo Piñón
Director



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

C.c.p.- Archivo

CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada **"Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria obtenidos a partir de las hojas de *Montanoa tomentosa*"** de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 24 días del mes de agosto del año 2020.

AUTORIZÓ



Eric Jaziel Medrano Sánchez
182a18001

Agradecimientos

Dr. Carlos Ernesto Lobato García, por darme la oportunidad de participar en este proyecto, por su paciencia y por su gran apoyo a lo largo de este periodo, que, más que verlo como un director de tesis, lo veo como un padre, el cual me ha enseñado, sin escatimar. Muchas gracias por su apoyo.

Dra. Isela Esther Juárez Rojop, por su tiempo, su dedicación y su paciencia en el desarrollo de este proyecto, por permitirme permanecer en su laboratorio y seguir trabajando, por su amabilidad con la que siempre me recibe siempre que llego a su laboratorio. Muchas gracias.

Dr. Manasés González Cortazar, por permitirme realizar mi estancia de investigación bajo su mentoría, por darme la oportunidad de aprender de su experiencia y permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por sus consejos y su amistad. Muchas gracias.

Gracias a todos ustedes, no cabe duda de que fui bien recibido por un gran grupo de investigadores.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, por su compañía y por los grandes momentos vividos.

A la comisión revisora

Gracias por su dedicación y observaciones a lo largo de la revisión de este trabajo

Dedicatoria

A mis padres

Quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede darle a un hijo, Amor. A quienes, sin escatimar en esfuerzos, han sacrificado gran parte de su vida, para formarme y educarme. A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en un gran profesionista.

Por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos, por cada día confiar y creer en mi, gracias a mi madre por todo el apoyo, esfuerzo y su amor que para mí es invaluable, gracias por estar a mi lado siempre, por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche; gracias a mi padre por ver por mí siempre, por desear y anhelar lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida

¡Por eso y más... LOS AMO...!

E.J.M.S.

Índice	
Abreviaturas	viii
Lista de figuras	x
Lista de gráficas.....	xii
Lista de tablas.....	xiii
Resumen.....	xiv
Abstract	xv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.2 Uso etnofarmacológico y farmacológico de <i>Montanoa tomentosa</i>	3
2.3 Composición química de <i>Montanoa tomentosa</i>	5
2.3.1. Monoterpenos y sesquiterpenos.....	5
2.3.2. Diterpenos.....	8
2.3.3. Flavonoides	11
3. Justificación	12
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivo general	14
6. Objetivos específicos	15
7. Materiales y métodos.....	16
7.1. Recolección del material vegetal.....	16
7.3. Identificación preliminar de compuestos presentes en la hoja de <i>Montanoa tomentosa</i>	17
7.4. Animales.....	17
7.5. Evaluación antinociceptiva de los extractos de <i>Montanoa tomentosa</i> en el modelo de Formalina.....	18
7.6. Evaluación antiinflamatoria de los extractos de <i>Montanoa tomentosa</i> en el modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA.....	19
7.7. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta.....	20
7.8. Elucidación de compuestos de <i>Montanoa tomentosa</i>	20
7.9. Análisis estadístico.....	20

8. Resultados y discusión	21
8.1 Rendimiento de los extractos obtenidos de la hoja de <i>Montanoa tomentosa</i>	21
8.2. Identificación preliminar de compuestos presentes en los extractos de la hoja de <i>Montanoa tomentosa</i>	21
8.3. Evaluación del efecto antinociceptivo de los extractos obtenidos de la hoja de <i>Montanoa tomentosa</i>	24
8.4. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos obtenidos de la hoja de <i>Montanoa tomentosa</i>	27
8.5. Separación por cromatografía en columna abierta del extracto bioactivo	29
8.6. Identificación de los compuestos obtenidos de <i>Montanoa tomentosa</i>	33
8.7. Evaluación preliminar de la actividad antinociceptiva de compuestos obtenidos a partir del extracto hexánico de <i>Montanoa tomentosa</i>	53
8.8. Evaluación preliminar del efecto antiinflamatorio de los compuestos obtenidos a partir del extracto hexánico de <i>Montanoa tomentosa</i>	56
8. Conclusiones	59
9. Perspectivas	60
10. Referencias	61

México. Universidad Autónoma de Tabasco.

Abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
AG	Ácido grandiflorénico
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AK	Ácido kaurenico
AM	Ácido monoginoico
Ang	Angeloil
ANOVA	Análisis de variancia de una vía
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Espectroscopia de correlación bidimensional protón/protón (siglas en inglés)
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigesasa-2
DMSO	Dimetilsulfóxido
ExAcOEt	Extracto de acetato de etilo
ExHex	Extracto hexánico
ExMeOH	Extracto metanólico
GABA	Ácido gamma-aminobutírico (siglas en inglés)
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (siglas en inglés)
IL-1, 6 y 8	Interleucina -1, 6 y 8
KTR	Ketorolaco
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
HMBC	Correlación heteronuclear de enlaces múltiples (siglas en inglés)
HSQC	Correlación cuántica heteronuclear simple (siglas en inglés)
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas (siglas en inglés)
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (siglas inglés)
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno (siglas en inglés)

MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos (siglas en inglés)
MLX	Meloxicam
mm	Milímetros
mg	Miligramos
MHz	Megahercio
min	Minutos
NF- κ B	Factor nuclear kappa-B (siglas en inglés)
PKA	Proteína quinasa C (siglas en inglés)
PKC	Proteína quinasa A (siglas en inglés)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
ppm	Partes por millón
RF	Factor de retención (siglas en inglés)
RMN	Resonancia Magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés)
t.a.	Temperatura ambiente
TNF	Factor de necrosis tumoral (siglas en inglés)
TPA	Acetato 12-O-tetradecanoilforbol (siglas en inglés)
ZACE	Extracto acuoso crudo de Zoapatle (siglas en inglés)

Lista de figuras

Figura 1. Montanoa tomentosa (zoapatle). Imagen capturada en el municipio de Santa María Tecuanulco, Estado de México, en agosto del 2019	2
Figura 2. Compuestos orgánicos volátiles mayoritarios reportados en Montanoa tomentosa. Sabineno (1), α -tujeno (2), α -pineno (3), α -gurjuneno (4), β -cariofileno (5), β -cubebeno (6) y germacreno D (7) (Quijano et al., 1985a).	6
Figura 3. Lactonas sesquiterpénicas del tipo heliangolida obtenidas de Montanoa tomentosa. Zoapatanolida A (9) y B (10).....	7
Figura 4. Lactonas sesquiterpénicas del tipo guayanolidas obtenidas de Montanoa tomentosa. Zoapatanolida C (11), zoapatanolida D (12), zoapatanolida E (13), zoapatanolida F (14) y pumilina (15).....	8
Figura 5. Zoapatanol (16) y montanol (17), diterpenos del tipo oxepano, presentes en Montanoa tomentosa.	9
Figura 6. Compuestos del tipo diterpenos, aislados de Montanoa tomentosa. Ácido monoginoico (18), zoapatlina (19), ácido grandiflorénico (20), ácido kaurenico (21) y monoginol (22).	10
Figura 7. Flavonoides aislados de M. tomentosa. Nicotiflorina (23) e isoquercetina (24).	11
Figura 8. Mapa de la ubicación del hábitat (N: 19°30'2.8728", W: -98°45'43.254"), Santa María Tecuanulco, Estado de México. (fuente: Google Maps)	16
Figura 9. a) CCF revelada a 360 nm, b) CCF revelada a 254 nm, c) CCF revelada con 4-hidroxibenzaldehído. Sistema de elución: Hex:AcOEt / 8:2.....	22
Figura 10. Cromatograma de HPLC y espectros de UV a 350 nm, del extracto de acetato de etilo de la hoja de Montanoa tomentosa.	23
Figura 11. Cromatograma de HPLC y espectros de UV a 350 nm del extracto metanólico de la hoja de Montanoa tomentosa.	23
Figura 12. Cromatografía en columna abierta CCA	30
Figura 13. CCF de la composición química de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento del extracto hexánico. Fase Normal/ sistema de elución: 90:10 Hex:AcOEt / revelador: Komarovsky (4-hidroxibenzaldehído).	31

Figura 14. CCF de la composición química de las fracciones obtenidas a partir de la fracción ZoaC2. Fase Normal/ sistema de elución: 90:10 Hex:AcOEt/revelador: Komarovsky (4-hidroxibenzaldehído).	32
Figura 15. Espectro de RMN- ¹ H (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 1 .	33
Figura 16. Espectro de RMN- ¹³ C (150 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 1 .	34
Figura 17. Experimento COSY (¹ H – ¹ H) (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 1 .	35
Figura 18. Experimento HSQC (¹ H – ¹³ C) (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 1 .	36
Figura 19. Espectrometría de masas del compuesto 1 , donde se muestra un pico máximo (301.17 m/z), presencia del ácido ent-kaura-9 (11), 16-dien-18-oico.	38
Figura 20. Espectro de RMN- ¹ H (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 2 .	39
Figura 21. Espectro de RMN- ¹³ C (150 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 2 .	40
Figura 22. Experimento COSY (¹ H - ¹ H) (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 2 .	41
Figura 23a. Experimento HSQC (¹ H- ¹³ C) (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 2 .	42
Figura 23b. Experimento HSQC (¹ H- ¹³ C) (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 2 .	42
Figura 24. Experimento HMBC (¹ H - ¹³ C) (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 2 .	43
Figura 25. Principales correlaciones de HMBC (¹ H - ¹³ C) del compuesto 2 .	43
Figura 26. Espectro de RMN- ¹ H (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 3 .	45
Figura 27. Espectro de RMN- ¹³ C (150 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 3 .	46
Figura 28. Estructura de un derivado E-cinámico en C-15 del esqueleto de kaureno.	47
Figura 29. Experimento COSY (¹ H - ¹ H) (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 3 .	47
Figura 30. Experimento HSQC (¹ H - ¹³ C) (600MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 3 .	48
Figura 31. Experimento HMBC (¹ H - ¹³ C) (600 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 3 .	49

Figura 32. Principales correlaciones HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) del compuesto 3	49
Figura 33. Espectrometría de masas del compuesto 3 , mostrando la presencia del compuesto 3 (pico 469.32 $[\text{M} + \text{Na}]^+$), además, se muestra la presencia del esqueleto del ácido ent-kaura-9 (11), 16-dien-18-oico (pico 299.29 $[\text{M} - \text{H}]^+$).	52

Lista de gráficas

Gráfica 1. Efecto de la administración de los extractos hexánico, acetato y metanólico sobre el comportamiento nociceptivo inducido por formalina durante la fase II. ketorolaco (KTR, 400 $\mu\text{g/pata}$), meloxicam (MLX, 400 $\mu\text{g/pata}$). Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 6 experimentos independientes. $*p < 0.05$ significativamente diferente en comparación con el vehículo. Análisis de una vía ANOVA, seguida de un estudio de Tukey (comparaciones entre grupos).	25
Gráfica 2. Efecto de la administración de los extractos hexánico, acetato y metanólico sobre la disminución de edema en oreja de ratón inducido por TPA, a una dosis de 1 mg/oreja. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 6 experimentos independientes. $*p < 0.05$ significativamente diferente en comparación con el grupo de indometacina (1 mg/oreja). Análisis de una vía ANOVA, seguida de un estudio de Tukey.....	28
Gráfica 3. Efecto de la administración de los compuestos 1 , 2 y 3 a una dosis de 50 $\mu\text{g/pata}$ sobre el comportamiento nociceptivo inducido por formalina durante la fase II. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 6 animales. $*p < 0.05$ significativamente diferente en comparación con el vehículo. Análisis de una vía ANOVA, seguida de un estudio de Tukey.	53
Gráfica 4. Efecto de la administración de los compuestos 1 , 2 y 3 a una dosis de 1 mg/oreja, sobre la disminución de edema inducido por TPA. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 6 animales. No se encontraron diferencias significativas ($* p < 0.05$) entre los compuestos y el fármaco de referencia. Análisis de una vía ANOVA, seguida de un estudio de Tukey.....	56

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Montanoa tomentosa</i>	3
Tabla 2. Rendimiento de los extractos obtenidos de la hoja de <i>Montanoa tomentosa</i>	21
Tabla 3. Porcentaje de antinocicepción a 400 µg/pata.....	26
Tabla 4. Datos espectroscópicos RMN- ¹ H (600 MHz) y RMN- ¹³ C (150 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 1	37
Tabla 5. Datos espectroscópicos RMN- ¹ H (600 MHz) y RMN- ¹³ C (150 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 2	44
Tabla 6. Principales datos de RMN- ¹ H reportados por Bohlmann (1978).....	50
Tabla 7. Datos espectroscópicos RMN- ¹ H (600 MHz) y RMN- ¹³ C (150 MHz) en CDCl ₃ , t.a., del compuesto 3	51

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Resumen

Montanoa tomentosa ha sido empleada en la medicina tradicional mexicana como agente inductor del parto y anticonceptivo, además de ser utilizada para el tratamiento del dolor después del parto. Sin embargo, aunque las mujeres son las principales usuarias de *Montanoa tomentosa*, son escasos los estudios que comprueban su potencial biológico. En ese sentido, en este estudio los extractos de las hojas de *Montanoa tomentosa* fueron evaluados en su actividad antinociceptiva empleando el modelo de formalina en rata y su actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA. La administración del extracto hexánico disminuyó el retiro espontáneo inducido por formalina en un 66.3 ± 3.0 %, teniendo un efecto similar mostrado por meloxicam (MXL) (64.3 ± 4.5 %), además, redujo el edema inducido por TPA en oreja de ratón en un 61.16 ± 3.8 %, mostrando un efecto similar a Indometacina 70.02 ± 1.24 %. De esta manera, el proceso de separación cromatográfica se realizó con el extracto que presentó una mayor actividad biológica. Así, a partir del extracto hexánico se obtuvo un nuevo derivado kaurenoide denominado como ácido *ent*-15 β -*E*-cinamoil-kaura-9(11),16-dien-19-oico (**3**) y dos terpenos conocidos: ácido grandiflorénico (**1**) y taraxasterol (**2**). Así mismo, se evaluó la actividad antinociceptiva de los compuestos obtenidos, siendo el compuesto **3**, el que presentó un mayor efecto con respecto al vehículo, mostrando una mayor disminución del efecto nociceptivo en la segunda fase de la prueba de formalina, además, redujo el edema inducido por TPA en 79.05 ± 3.07 % con respecto a Indometacina 70.20 ± 1.26 %. Estos resultados comprueban el uso de *Montanoa tomentosa* como un nuevo agente antinociceptivo y antiinflamatorio, además de brindarnos información que nos permite proponer alternativas de usos potenciales.

Abstract

Montanoa tomentosa has been used in traditional Mexican medicine as a birth inducing agent and contraceptive, as well as for the treatment of pain after childbirth. However, although women are the main users of *Montanoa tomentosa*, there are few studies that prove its biological potential. In this study, the extracts of the leaves of *Montanoa tomentosa* were evaluated in their antinociceptive activity using the rat formalin model and their anti-inflammatory activity in the mouse ear edema model induced by TPA. The administration of the hexanic extract decreased the formalin-induced spontaneous withdrawal by 66.3 ± 3.0 %, having a similar effect shown by meloxicam (MXL) (64.3 ± 4.5 %), in addition, it reduced the TPA-induced mouse ear edema by 61.16 ± 3.8 %, showing a similar effect to Indomethacin 70.02 ± 1.24 %. In this way, the chromatographic separation process was performed with the extract that presented the highest biological activity. Thus, from the hexanic extract a new kaurenoid derivative was obtained called ent-15 β -E-cinamoil-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid (**3**) and two known terpenes: grandiflorenic acid (**1**) and taraxasterol (**2**). Furthermore, the antinociceptive activity of the obtained compounds was evaluated, being compound (**3**) the one that presented a greater effect with respect to vehicle, showing a greater decrease of the nociceptive effect in the second phase of the formalin test, in addition, it reduced the edema induced by TPA in 79.05 ± 3.07 % with respect to Indomethacin 70.20 ± 1.26 %. These results prove the use of *Montanoa tomentosa* as a new antinociceptive and anti-inflammatory agent, besides providing information that allows us to propose alternatives of potential uses.

1. Introducción

En México existe una gran riqueza de plantas con propiedades terapéuticas, que han sido utilizadas durante siglos como tratamiento para aliviar diversas enfermedades, dentro de las cuales encontramos a *Montanoa tomentosa* o *cihuapatli* “medicina de las mujeres”, término atribuido a que en la medicina tradicional se utilizaba como un agente auxiliar en inducción del parto, anticonceptivo, irregularidades en la menstruación, para curar los “nervios” y para el tratamiento de dolores en las mujeres después del parto (Vázquez *et al.*, 2011. Behar, 1988). Dentro de la composición química, *Montanoa tomentosa* presenta una variedad de compuestos interesantes, como diterpenos del tipo kaureno (ácido grandiflorenico, ácido kaurenoico, zoapatanol, montanol y tomentol) los cuales se han demostrado responsables del efecto uterotónico y uterorrelajante (Enríquez *et al.*, 1997. Campos-Bedolla *et al.*, 1997. Lozoya *et al.*, 1983), además de presentar otras actividades como: antimicrobianos, fungicidas, antiinflamatorios y citotóxicos (Ghisalberti, 1997). Por otra parte, se han aislado sesquiterpenos como: tomentosina, zoapatanolidas A-F, montafusinas A-F y derivados de pumilina, esteroides (estigmasterol) y flavonoides (isoquercitrina y nicotiflorina) (Levine *et al.*, 1981. Gallegos, 1983. Oshima *et al.*, 1986b. Bejar *et al.*, 2000. Ríos-Castillo *et al.*, 2012). En ese sentido, *Montanoa tomentosa*, promete ser una ruta alternativa para la obtención de compuestos con aplicación terapéutica. Sin embargo, a pesar de que las mujeres son las principales usuarias de *Montanoa tomentosa*, son pocos los reportes que aporten al impacto potencial del efecto antinociceptivo o antiinflamatorio. De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este proyecto fue determinar el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de *Montanoa tomentosa*, empleando el modelo de formalina y edema en oreja de ratón inducido por TPA.

2. Antecedentes

Dentro de la medicina tradicional mexicana, existe un grupo de plantas útiles para el tratamiento de padecimientos relacionados con la biología de la reproducción femenina, grupo del cual destaca el zoapatle, denominada así por las raíces náhuatl “*cihuatl* = mujer” y “*phatli* = medicina”, refiriéndose como “medicina de la mujer”, siendo empleada como infusión para inducir el trabajo de parto, regular el ciclo menstrual y como anticonceptivo natural. Posteriormente, Vicente Cervantes en 1790 le asignó el nombre científico *Montanoa tomentosa*, en alusión al médico mexicano Luis Montaña, quien dedicó parte de su investigación al estudio de los efectos terapéuticos de la planta relacionados con sus propiedades uterotónicas (Villa-Ruano, 2013. Gallegos, 1983). *Montanoa tomentosa* (Figura 1) es un arbusto ramificado que puede llegar a medir 3 metros de altura. Las estructuras florales se disponen en forma de cabezuelas constituidas por un número de unidades florales hermafroditas de color variable (Funk y Brooks, 1990).



Figura 1. *Montanoa tomentosa* (zoapatle). Imagen capturada en el municipio de Santa María Tecuanulco, Estado de México, en agosto del 2019

El periodo de floración oscila entre los meses de junio-agosto, época caracterizada por abundantes lluvias. Las semillas están generalmente almacenadas en aquenios, presentando raíces de tipo fibroso con una delgada corteza aromática por la presencia de resina y un xilema secundario delgado (Funk y Brooks, 1990).

2.1. Clasificación taxonómica de *Montanoa tomentosa*

En la tabla 1 se presenta la clasificación taxonómica de *Montanoa tomentosa*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Montanoa tomentosa*

Reino:	<i>Plantae</i>	Género:	<i>Montanoa</i>
phylum o división:	<i>Tracheophyta</i>	Especie:	<i>Montanoa tomentosa</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>	Nombre científico:	<i>Montanoa tomentosa</i>
Orden:	<i>Asteraceae</i>	Subespecie:	<i>tomentosa</i>
Familia:	<i>Compositae</i>	(Sch.Bip. ex C.Koch) B.L.Turner	

A pesar del uso tradicional de *Montanoa tomentosa* como un anticonceptivo natural, fue hasta principios de la década de los setentas del siglo pasado que se inició con la investigación en torno a sus aplicaciones, teniendo como objetivo la búsqueda de nuevos compuestos que permitieran disminuir el impacto poblacional que se presentaba en esa época a nivel mundial. Además, estos estudios condujeron al desarrollo de técnicas analíticas como la espectroscopía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y permitieron el avance tecnológico en el análisis de experimentos uni y bidimensionales de Resonancia Magnética Nuclear para la caracterización estructural inequívoca de compuestos aislados de plantas, llevando al hallazgo de compuestos con diversas aplicaciones terapéuticas y biotecnológicas (Caballero y Walls, 1970).

2.2 Uso etnofarmacológico y farmacológico de *Montanoa tomentosa*

De acuerdo a Gallegos (1983), los reportes más antiguos del uso etnofarmacológico de *Montanoa tomentosa* datan de 1529 y en ellos se refiere que se realizaba la administración oral de una infusión de la planta para el tratamiento de padecimientos relacionados con la biología de la reproducción femenina, como: regulador del ciclo menstrual, abortivo, anticonceptivo (Gallegos, 1983. Bejar *et al.*, 2000). Por otra parte, ya desde épocas coloniales *Montanoa tomentosa* era empleada para el tratamiento del dolor después de la inducción el parto, lo cual se sigue llevando a cabo con ese fin en diferentes comunidades (Vázquez *et al.*, 2011). Dado a su uso extendido en diferentes épocas, fue hasta 1970 que se iniciaron con los estudios *in vitro* de extractos crudos de *Montanoa tomentosa*, sin embargo, no se encontró un efecto uterotónico en

el modelo propuesto (Carro-Juárez *et al.*, 2006), por lo tanto, gran parte del trabajo de laboratorio fue abandonado. Posteriormente, en un estudio clínico presentados en 1979, se demostró que la administración de una decocción de las hojas de *Montanoa tomentosa* en mujeres que se encontraban en las primeras etapas del embarazo, ejerció un efecto uterotónico distintivo e indujo dilatación cervical y sangrado en útero sin cambios asociados sobre los niveles plasmáticos de progesterona y estradiol ni con ningún efecto secundario adverso, corroborando que el extracto crudo acuoso de *Montanoa tomentosa* puede ser útil en el desarrollo de un abortivo activo y seguro administrado por vial oral (Landgren *et al.*, 1979). Con base en estos estudios, la falta de una evaluación biológica adecuada de los extractos crudos de *Montanoa tomentosa* impulsó el desarrollo de un modelo biológico confiable para comparar los efectos biológicos de fármacos disponibles como la oxitocina con respecto a los extractos de *Montanoa tomentosa* de manera sistemática y así poder documentar un efecto biológico de manera consistente, reproducible y confiable que proporcionara una base racional para el uso de los extractos de *Montanoa tomentosa* como un agente uterotónico. En ese sentido, se efectuaron estudios de extractos crudos de *Montanoa tomentosa* en diferentes modelos animales, demostrándose que la administración de los extractos crudos aumenta la contracción en útero de cerdo, hámster, conejo, perro, mono y humano, e inhibe la actividad espontánea en rata (Morales *et al.*, 2018. Lagunes-Merino *et al.*, 2019. Robles-Zepeda *et al.*, 2006. Gertsch *et al.*, 2008). Más recientemente, se han demostrado otras actividades farmacológicas de *Montanoa tomentosa*, como: pro-eyaculador, causando un aumento en el número de descargas en los patrones motores eyaculadores en ratas Wistar macho, además, produce la expresión de erecciones enanas, movimientos del pene y la potente expulsión del contenido uretral y, en algunos casos, la expulsión de tapones seminales (Carro-Juárez *et al.*, 2006). Por otra parte, se reportó que la administración de un liofilizado de *Montanoa tomentosa* comparte un mecanismo de acción similar en el que el receptor GABAA juega un papel importante y corrobora su uso como ansiolítico potencial (Sollozo-Dupont *et al.*, 2015). Por otra parte, se demostró la actividad antiinflamatoria de una pomada preparada a base de extracto etanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa* aplicada de manera periférica local en un modelo de carragenina en ratas Wistar (Morales *et al.*, 2018). También se demostró el efecto antidepresivo

parcial de una administración aguda de la infusión de *Montanoa tomentosa*, los autores sugieren que este efecto podría estar asociado con la activación de neuronas oxitocinérgicas hipotalámicas en ratas, por lo que difiere del mecanismo de acción típico involucrado en medicamentos antidepresivos como la fluoxetina, que actúan sobre la vía serotoninérgica (Quijano *et al.*, 1984).

2.3 Composición química de *Montanoa tomentosa*

Dentro de los compuestos más relevantes aislados a partir de *Montanoa tomentosa*, podemos encontrar terpenos, como: monoterpenos; compuestos formados por dos unidades de isopreno, sesquiterpenos (tres unidades) y diterpenos (cuatro unidades), siendo su biogénesis a partir de la ruta del ácido mevalónico, así como algunos flavonoides, provenientes de la ruta del ácido shikímico (Dewik, 2009). En ese sentido, el aislamiento de diferentes compuestos obtenidos de plantas, ha permitido el desarrollo de diferentes técnicas analíticas, como: cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, siglas en inglés), la cual nos permite la separación de los componentes de una mezcla y su posterior detección, de igual manera, el avance tecnológico en experimentos de Resonancia Magnética Nuclear en una dimensión (^1H y ^{13}C), que, mediante los diferentes entornos químicos, se puede obtener información estructural sobre la molécula en una muestra, además, de experimentos en dos dimensiones como: Espectroscopía de Correlación Bidimensional protón/protón (COSY, siglas en inglés), y experimentos de correlación heteronuclear como: Correlación Cuántica Heteronuclear Simple (HSQC, siglas en inglés), experimento que permite la detección de la conexión carbono-protón a un enlace y la Correlación Heteronuclear de Enlaces Múltiples (HMBC, siglas en inglés), la cual permite la detección de protones que muestra los carbonos que se encuentran a 2 o 3 enlaces de distancia de los protones. De igual manera, permitió el desarrollo de modelos biológicos, que han permitido la comprensión de las diferentes aplicaciones biológicas de componentes activos obtenidos de plantas con potencial aplicación terapéutica y biotecnológica (Caballero & Walls, 1970; Enríquez *et al.*, 1996).

2.3.1. Monoterpenos y sesquiterpenos

El perfil químico obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS, siglas en inglés) de una fracción volátil de *Montanoa tomentosa*

reveló la presencia de monoterpenos como sabineno (1), α -tujeno (2) y α -pineno (3), además, se identificaron sesquiterpenos como α -gurjunene (4), β -cariofileno (5), β -cubebeno (6) y germacreno D (7) (Figura 2). La caracterización de los compuestos volátiles de *Montanoa tomentosa* ha proporcionado una visión significativa de sus aplicaciones, por ejemplo el compuesto (1), identificado como el más abundante en las hojas y flores de *Montanoa tomentosa*, es utilizado en la síntesis de componentes utilizados en perfumes; al compuesto (5) se le ha atribuido actividad antiinflamatoria, en el modelo de edema inducido por carragenina en ratón (Quijano *et al.*, 1991), y (7) es un componente en píldoras utilizadas en enfermedades oculares (Quijano *et al.*, 1985a).

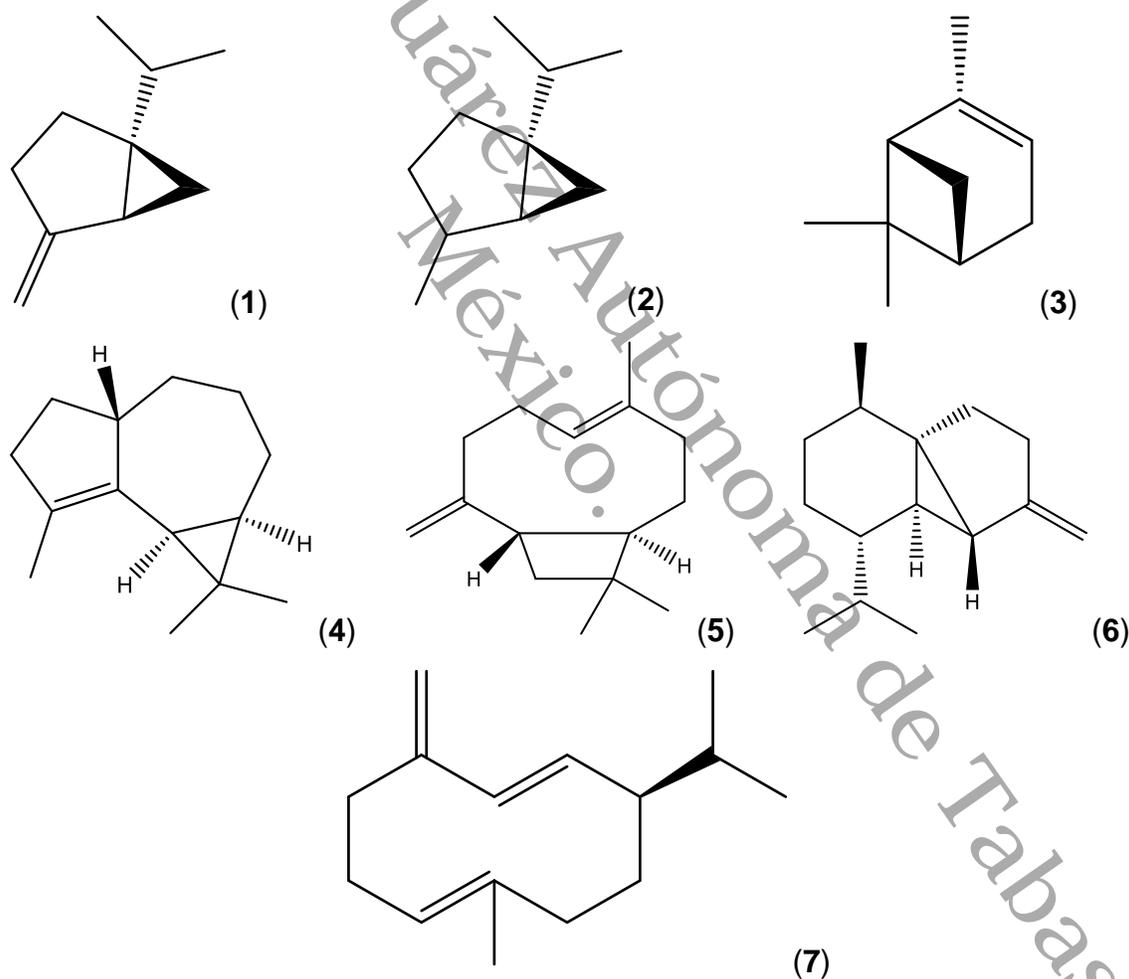


Figura 2. Compuestos orgánicos volátiles mayoritarios reportados en *Montanoa tomentosa*. Sabineno (1), α -tujeno (2), α -pineno (3), α -gurjuneno (4), β -cariofileno (5), β -cubebeno (6) y germacreno D (7) (Quijano *et al.*, 1985a).

Por otra parte, se reportó la primera lactona sesquiterpénica denominada tomentosina (**8**), aislada a partir de las hojas de *Montanoa tomentosa*, cuya estructura fue determinada mediante estudios de RMN ^1H . El compuesto (**8**) ha demostrado tener actividades antineoplásicas y antifúngicas (Lu *et al.*, 1987. Levine *et al.*, 1979). Posteriormente, se aislaron dos nuevas lactonas sesquiterpénicas del tipo heliangolida, denominadas zoapatanolida A (**9**) y B (**10**) (Levine *et al.*, 1981; Figura 3). Además, se reportó la presencia de lactonas sesquiterpénicas del tipo guayanolidas, las cuales fueron nombradas como zoapatanolida C-F (**11-14**), y la pumilina (**15**; Figura 4). Estas estructuras fueron establecidas por extensos estudios de RMN ^1H y experimentos de desacoplamiento spin-spin, así como propiedades físicas (punto de fusión, rotación óptica, absorción UV; Smith *et al.*, 1981. Hahn *et al.*, 1984. Quijano *et al.*, 1985b).

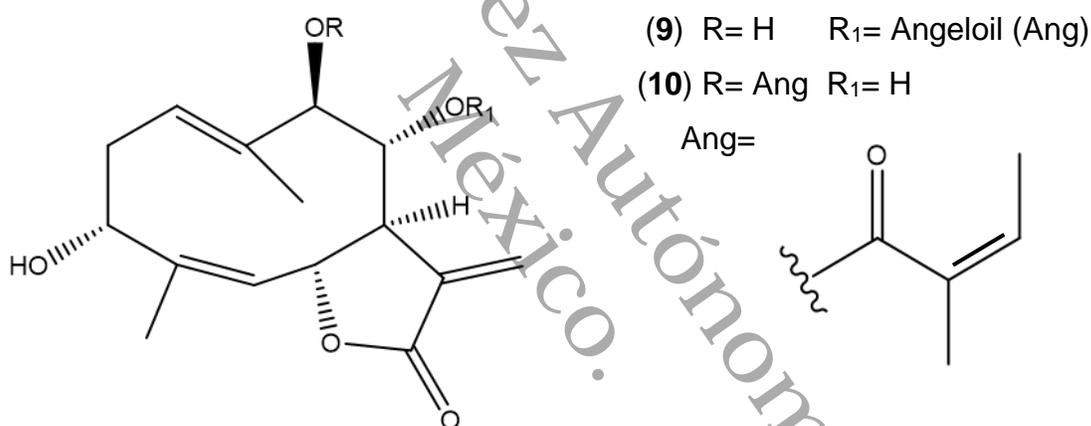
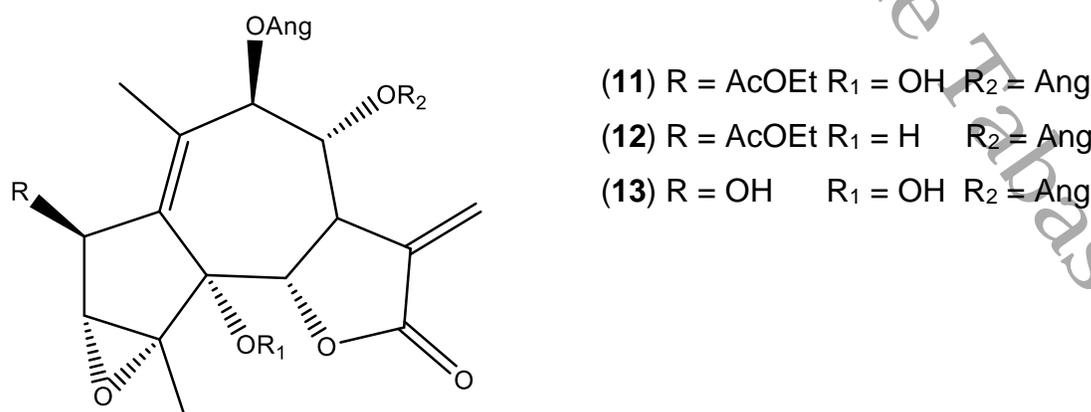
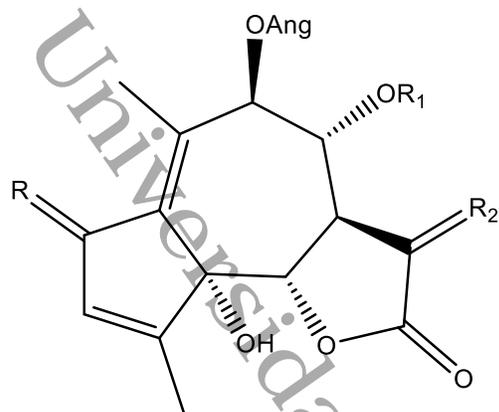


Figura 3. Lactonas sesquiterpénicas del tipo heliangolida obtenidas de *Montanoa tomentosa*. Zoapatanolida A (**9**) y B (**10**).





(14) R = H₂ R₁ = AcOEt R₂ = α-Me, H

(15) R = O R₁ = H R₂ = CH₂

Figura 4. Lactonas sesquiterpénicas del tipo guaianolidas obtenidas de *Montanoa tomentosa*. Zoapatanolida C (11), zoapatanolida D (12), zoapatanolida E (13), zoapatanolida F (14) y pumilina (15).

La relación estructural entre zoapatanolidas (9-14) sugieren que podrían tener propiedades análogas. Sin embargo, solo el compuesto (9) ha sido probado y se ha encontrado que inhibe la contracción en tiras uterinas *in vitro* (Oshima *et al.*, 1986a).

2.3.2. Diterpenos

Los estudios encaminados en la obtención de los compuestos con actividad uterotónica presentes en *Montanoa tomentosa*, resultó en el aislamiento de dos diterpenos con un anillo de oxepano en su estructura (Figura 5), que se nombraron zoapatanol (16) y montanol (17) (Bejar *et al.*, 2000. Caballero y Walls, 1970). Se creía que (16) era el responsable de la actividad uterotónica de los extractos crudos acuosos de zoapatle. Sin embargo, se demostró que el uso individual de (16) no presentaba un efecto significativo en distintos modelos *in vitro* (Ponce-Monter *et al.*, 1983). Solo se confirmó que un análogo sintético de (16), denominado ORF 13811, presentó actividad anti-fertilidad cuando se administraba por vía oral a cobayas (Bejar *et al.*, 1984). A pesar de estos hallazgos, otros trabajos propusieron que (16) era el compuesto asociado a la interrupción del embarazo y que (17) causa la inhibición de la contracción espontánea de las tiras uterinas de cobaya *in vitro* (Zamilpa *et al.*, 2002. Enriquez *et al.*, 1996). A partir de entonces, se han reportado numerosos trabajos sobre la síntesis de estos diterpenos. Sin embargo, los farmacólogos han llegado a la conclusión que el efecto de la infusión de zoapatle no puede ser reproducida por uno solo de los

compuestos presentes, por lo que probablemente se trata de un fenómeno de sinergismo (Mi *et al.*, 2002).

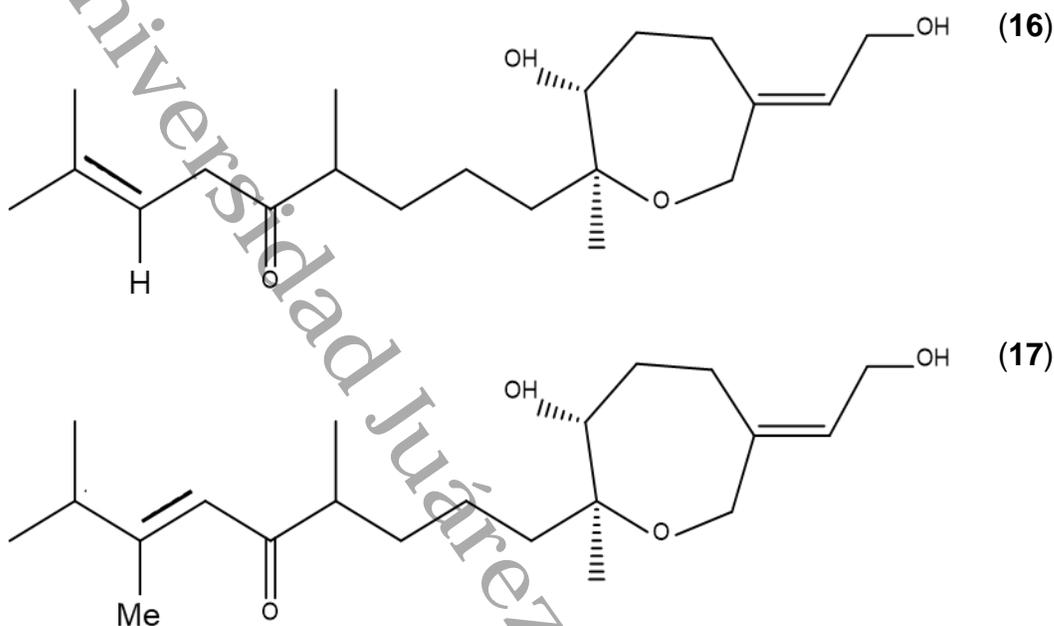
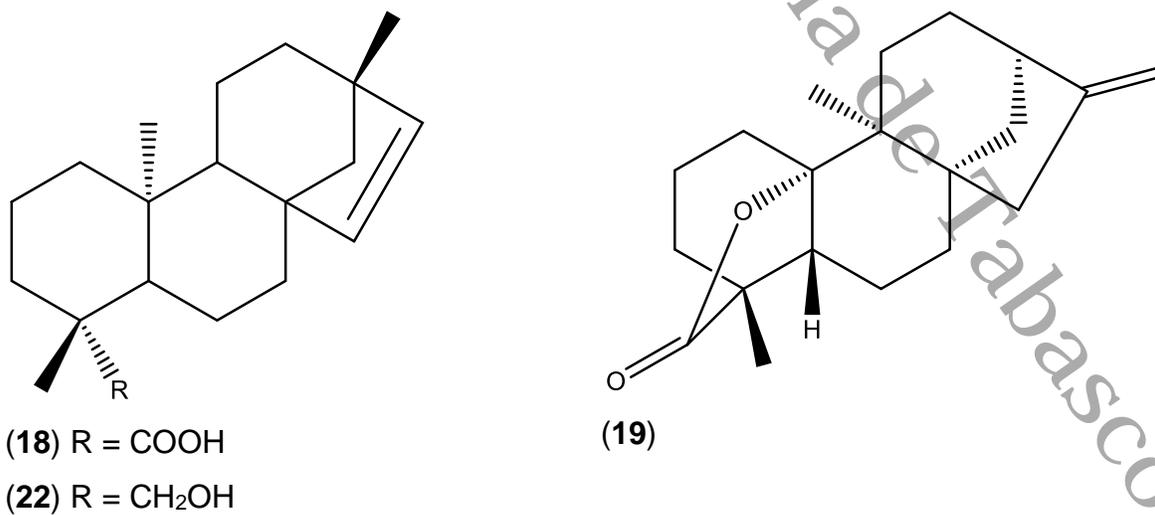


Figura 5. Zoapatanol (16) y montanol (17), diterpenos del tipo oxepano, presentes en *Montanoa tomentosa*.

Así mismo, se realizó el aislamiento de dos nuevos diterpenos del tipo kaureno; el ácido monoginoico (18) y la zoapatlina (19) una lactona diterpénica, además del ácido grandiflorénico (20), ácido kaurenoico (21), y el monoginol (22) (Figura 6) (Ponce-Monter *et al.*, 1983).



2.3.3. Flavonoides

Se ha reportado la obtención de nicotiflorina (**23**) e isoquercetina (**24**; Figura 7) a partir de un extracto metanólico de las hojas *Montanoa tomentosa* (Oshima *et al.*, 1986c).

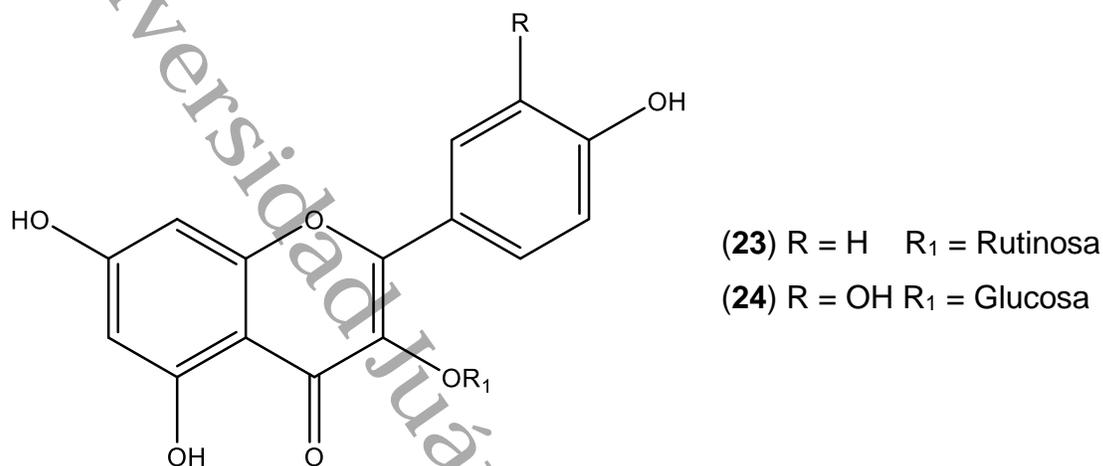


Figura 7. Flavonoides aislados de *M. tomentosa*. Nicotiflorina (**23**) e isoquercetina (**24**).

Se ha demostrado el uso del compuesto (**23**) como un neuroprotector novedoso y eficiente, utilizado como un agente contra la isquemia cerebral focal permanente inducida en ratas (Li *et al.*, 2006); además, se le atribuye la mejora de la memoria y contrarresta el estrés oxidativo (Huang *et al.*, 2007). Por otra parte, el compuesto (**24**) es un eficaz supresor de la inflamación eosinofílica y su uso se ha propuesto para el tratamiento de alergias (Rogerio *et al.*, 2007). De igual manera, este compuesto se asoció con la reducción de la proliferación celular glioblastomal (Amado *et al.*, 2009). La investigación realizada con respecto al uso tradicional de *Montanoa tomentosa* como un anticonceptivo natural para solucionar el impacto poblacional que se presentaba en los años 70's, resultó en el aislamiento de compuestos con diversas aplicaciones terapéutica, además, permitió el desarrollo de técnicas analíticas que, hasta la fecha, permiten determinación y elucidación inequívoca de compuestos aislados de plantas. En ese sentido, estos estudios amplían la perspectiva para realizar investigaciones posteriores sobre *Montanoa tomentosa* como una ruta alternativa para la obtención de compuestos con potencial aplicación biológica.

3. Justificación

La selección de plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades es uno de los enfoques alternativos en el proceso de desarrollo de fármacos, ya que contienen diversos fitoconstituyentes que pueden poseer diversas aplicaciones biológicas. En ese sentido, *Montanoa tomentosa* es una planta mexicana que parece marcar una muy prometedora ruta para la obtención de compuestos activos con diversas aplicaciones biológicas. Sin embargo, si bien, las mujeres son las principales usuarias de *Montanoa tomentosa*, hasta la fecha son escasos los estudios que reporten el impacto potencial del efecto antinociceptivo o antiinflamatorio. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue determinar el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de *Montanoa tomentosa*, con la finalidad de contar con información que permita proponer alternativas de usos potenciales de *Montanoa tomentosa*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

4. Hipótesis

En las hojas de *Montanoa tomentosa* existen compuestos con potencial actividad antinociceptiva y antiinflamatoria que permiten obtener alternativas de uso terapéutico.

5. Objetivo general

- Aislar, caracterizar y evaluar la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de compuestos activos presentes en las hojas de *Montanoa tomentosa*.

6. Objetivos específicos

- Recolectar las hojas de *Montanoa tomentosa*.
- Obtener los extractos de la hoja de *Montanoa tomentosa*, empleando disolventes de polaridad creciente (*n*-hexano, acetato de etilo, metanol).
- Evaluar la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de los extractos crudos de la hoja de *Montanoa tomentosa* en el modelo de formalina en ratas Wistar y en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA, respectivamente.
- Aislar metabolitos secundarios presentes en el extracto bioactivo de *Montanoa tomentosa* mediante una extracción selectiva empleando métodos cromatográficos.
- Efectuar la caracterización estructural de los compuestos aislados mediante técnicas analíticas: cromatografía de líquidos de alta resolución y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C en una y dos dimensiones.
- Evaluar la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de los compuestos aislados de la hoja de *Montanoa tomentosa* en el modelo de formalina en ratas Wistar y en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA, respectivamente.

7. Materiales y métodos

7.1. Recolección del material vegetal

El material vegetal fue recolectado en Santa María Tecuanulco, localizado en el Estado de México (Figura 8), en el periodo de junio-agosto del 2019.



Figura 8. Mapa de la ubicación del hábitat (N: 19°30'2.8728", W: -98°45'43.254"), Santa María Tecuanulco, Estado de México. (fuente: Google Maps)

Se preparó el ejemplar correspondiente para herbario, cuya identificación taxonómica fue realizada en el Herbario de la División Académica de Ciencias Biológicas – UJAT. El ejemplar fue asignado con el número de folio 035341.

7.2. Preparación de los extractos de *Montanoa tomentosa*

Para la elaboración de los extractos se emplearon únicamente las hojas de la planta, que fueron secadas en una estufa eléctrica a 45° C durante 24 horas para eliminar el agua residual. El material vegetal seco fue molido y cribado a través de un tamiz de 0.23 pulgadas para obtener una muestra homogénea. La obtención de los extractos de *Montanoa tomentosa*, se realizó mediante una extracción seriada utilizando disolventes grado analítico de menor a mayor polaridad, de primera instancia se utilizó como disolvente *n*-hexano, macerando el material vegetal por 24 horas, posterior a la extracción se evaporó el disolvente a presión reducida empleando un rotavapor (Heildoph G3™) para obtener el extracto hexánico (ExHex), repitiendo el proceso por triplicado para extraer exhaustivamente los compuestos no polares. Posteriormente el material vegetal se maceró con acetato de etilo por 24 horas, después de la extracción

se evaporó el disolvente empleando un rotavapor (Heildoph G3™) para obtener el extracto de acetato de etilo (EXAcOEt), proceso realizado por triplicado. Por último, el material vegetal se maceró con metanol, eliminando el disolvente a presión reducida para obtener el extracto metanólico (EXMeOH). Finalmente se calculó el rendimiento de los extractos mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100$$

7.3. Identificación preliminar de compuestos presentes en la hoja de *Montanoa tomentosa*

Se realizó una identificación de compuestos presentes en los extractos ExHex, EXAcOEt y EXMeOH, mediante el uso de cromatografía de capa fina (en fase normal), utilizando como agente revelador el reactivo de Komarovsky (4-hidroxibenzaldehído). Además, se empleó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, siglas en inglés) mediante el equipo *Waters* equipado con un detector de arreglo de fotodiodos *Waters* 2996 UV (900) a 280 nm, empleando el software *Empower Pro* y una columna *Supelcosil LC-F* (4.6 mm × 250 mm, tamaño de partícula de 5 μm) (*Supelguard™ Cartridge* - *Sigma-Aldrich*, Bellefonte, EE. UU.). La fase móvil consistió en una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,5% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El sistema de gradiente fue el siguiente: 0-1 min, 0 % B; 2-3 min, 5 % de B, 4-20 min, 30 % de B; 21-23 min, 50 % de B; 24-25 min, 80 % de B; 26-27 100 % de B; 28-30 min, 0 % B. La velocidad de flujo se mantuvo a 0.9 ml min⁻¹ utilizando 10 μL de inyección de muestra y una detección de rango de longitud de onda de 190-600 nm.

7.4. Animales

Para las distintas evaluaciones de la actividad antinociceptiva de los extractos y compuestos obtenidos de las hojas de *Montanoa tomentosa*, se emplearon ratas *Wistar* macho con un peso inicial aproximado de 180-200 g, las cuales fueron adquiridas a través de la Unidad de Producción, Cuidado y Experimentación Animal (UPCEA) ubicado en la División Académica de Ciencias Básicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Por otra parte, en la actividad antiinflamatoria de los extractos y compuestos obtenidos de las hojas de *Montanoa tomentosa*, se emplearon ratones de la cepa *ICR* con un peso inicial de 20-30 g, los cuales fueron adquiridos a través

del bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social. Lo anterior, se realizó siguiendo las medidas establecidas en la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

7.5. Evaluación antinociceptiva de los extractos de *Montanoa tomentosa* en el modelo de Formalina

Los extractos se evaluaron en su actividad antinociceptiva empleando el modelo de formalina (Dubuisson D. y Dennis S.G., 1977), con el fin de explorar alteraciones en la sensibilidad a un estímulo doloroso (formalina) después de la administración de los extractos y poder validar su posible propiedad analgésica (alivio del dolor). Para esta evaluación se utilizaron ratas Wistar macho, con un peso inicial aproximado de 180-200 g (n=6 por cada tratamiento), adaptadas a las condiciones del bioterio con periodos de luz/oscuridad de 12 x 12 horas y a una temperatura de 25° C, con acceso libre de alimento comercial Harlan para roedores y agua purificada. Antes de la prueba, las ratas se colocaron individualmente durante una hora en cilindros de acrílico transparente de 20 cm de diámetro y 40 cm de altura. En la parte trasera de estos cilindros se colocaron previamente dos espejos de 40 x 40 cm para facilitar su observación. Posterior a ese periodo de adaptación, se administraron vía subcutánea los extractos en sus diferentes dosis (50, 100, 200 y 400 µg) en la región dorsal de la pata derecha de la rata. El control positivo fue el grupo al cual se le administro ketorolaco (400 µg/pata) y meloxicam (400 µg/pata). Un grupo control recibió DMSO al 50 % como vehículo. Todos los extractos y fármacos se disolvieron en DMSO al 50 %. Después de 10 minutos, se administraron 50 µL de una solución de formalina al 1 % por vía subcutánea en la superficie dorsal de la pata trasera derecha. La conducta nociceptiva fue cuantificada durante un periodo de 1 min cada 5 min, durante 1 hora, observándose dos fases de comportamiento de retroceso espontáneo: la fase 1 comenzó inmediatamente después de la inyección de formalina hasta los 10 minutos y la fase 2 comenzó posterior a los 10 minutos, observándose una respuesta máxima alrededor de 20-45 minutos después de la inyección de formalina. En este modelo, la disminución en el número de sacudidas de la pata se interpretó como efecto antinociceptivo (Dubuisson D, y Dennis SG., 1977). La evaluación antinociceptiva de

los compuestos obtenidos de las hojas de *Montanoa tomentosa* se realizó en el modelo descrito anteriormente, empleando una dosis de 50 µg/pata de cada compuesto.

7.6. Evaluación antiinflamatoria de los extractos de *Montanoa tomentosa* en el modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA

La inflamación se indujo siguiendo el método descrito previamente por Payá *et al.* (1993). Para esta evaluación se utilizaron ratones machos de la cepa ICR con un peso inicial aproximado de 20-30 g (n=6 por cada tratamiento). Los ratones fueron mantenidos a una temperatura de 22° C ± 3° C, con 70 % ± 5 % de humedad, con periodos de luz/oscuridad de 12 x 12 horas, con acceso libre de alimento y agua purificada. La dosis evaluada para los extractos fue de 1.0 mg, la cual se administró de manera tópica en la oreja del ratón. Un grupo control recibió acetona como vehículo y se utilizó como control positivo antiinflamatorio Indometacina adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA; número de producto: I7378), a una dosis de 1.0 mg/oreja. Todos los extractos y fármacos se disolvieron en acetona y fueron administrados por vía tópica en ambas orejas inmediatamente después de la administración de TPA. Seis horas después de la administración del agente inflamatorio, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomaron secciones circulares (6 mm de diámetro) tanto de los tratados (t) y no tratados (nt), posteriormente se pesaron para determinar la magnitud de la inflamación (Payá *et al.*, 1993). La evaluación antiinflamatoria de los compuestos obtenidos de las hojas de *Montanoa tomentosa* se realizó en base al modelo descrito anteriormente, empleando una dosis de 1.0 mg/oreja de cada compuesto.

El porcentaje de inhibición se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Control} - \text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100$$

7.7. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta

El extracto que resultó más activo en la evaluación del efecto antinociceptivo y antiinflamatorio, se sometió a un proceso de fraccionamiento químico mediante la técnica de cromatografía en columna abierta, utilizando como soporte fase normal (gel de sílice, malla 70-230), empleando los eluyentes apropiados y las proporciones adecuadas de extracto para optimizar el proceso de separación.

La separación de las fracciones se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF) para llevar a cabo el seguimiento del fraccionamiento químico, así como para decidir cuales fracciones podían agruparse con base en su contenido químico. Para ello se utilizaron láminas de aluminio con Sílica gel 60 RP-18 F254s (105560-Merck KGaA). El análisis de las placas se realizó a través del revelado con lámpara de luz ultravioleta (UV) a 254 y 360 nm. Como sistema de detección química se utilizó el reactivo de Komarovsky, el cual es útil para la detección de compuestos del tipo terpeno.

7.8. Elucidación de compuestos de *Montanoa tomentosa*

La determinación estructural de los compuestos aislados del extracto activo de *Montanoa tomentosa* se realizó mediante el empleo de experimentos uni y bidimensionales de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C . Para ello se utilizó el equipo Bruker Ascend 600 equipado con una consola Advance III HD de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Para el análisis de los espectros se utilizó el software MestReNova 14.1.

7.9. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar de la media de una muestra de 6 animales por grupo. Todos los datos fueron comparados con sus respectivos controles mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey (comparaciones múltiples entre los tratamientos) con ayuda del programa GraphPad Prism 8.0, considerando como significativo una $*p < 0.05$.

8. Resultados y discusión

Las plantas medicinales son un recurso importante en México debido a que son una prometedora ruta para la obtención de compuestos activos. Actualmente, los productos naturales son una alternativa terapéutica para el tratamiento de diferentes enfermedades; existen reportes que demuestran que estos productos contienen metabolitos secundarios responsables del efecto terapéutico.

8.1 Rendimiento de los extractos obtenidos de la hoja de *Montanoa tomentosa*

En la obtención de los extractos de *Montanoa tomentosa* se observó una mayor cantidad de extracto metanólico en comparación con el extracto hexánico, y de acetato de etilo, lo cual indica la presencia de compuestos de mayor polaridad (Tabla 2).

Tabla 2. Rendimiento de los extractos obtenidos de la hoja de *Montanoa tomentosa*

Disolvente	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano	78	5
Acetato de etilo	119	8
Metanol	167	11

Se emplearon 1500 g de hoja seca.

8.2. Identificación preliminar de compuestos presentes en los extractos de la hoja de *Montanoa tomentosa*

En la Figura 9 se muestra el contenido químico del extracto hexánico. En esta figura se aprecia mediante el factor de retención (RF) de los compuestos observados, que el extracto hexánico contiene principalmente compuestos de baja y mediana polaridad. Así mismo, el revelado químico con Komarovsky permitió observar marcas de color morado, además de marcas de colores azul, verde y amarillo, características que indican la presencia de terpenos.

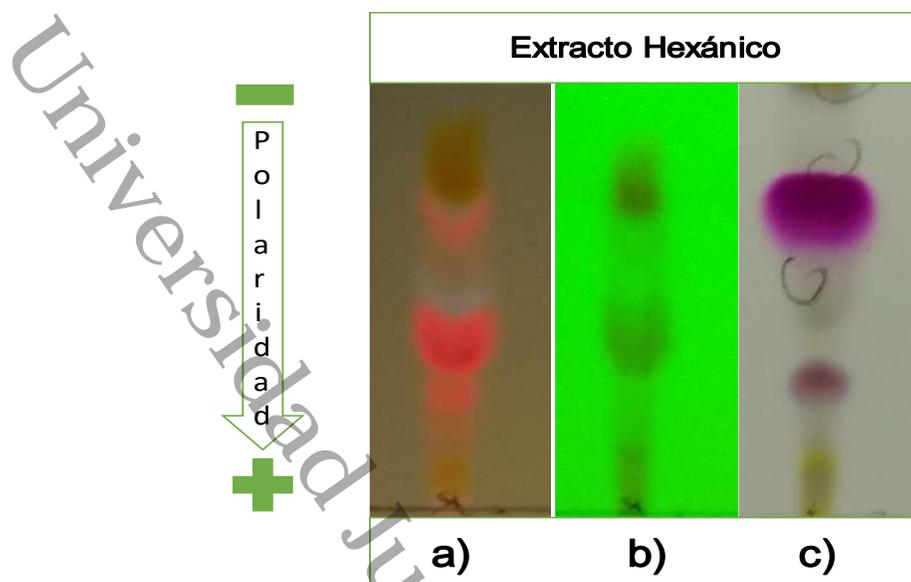


Figura 9. a) CCF revelada a 360 nm, b) CCF revelada a 254 nm, c) CCF revelada con 4-hidroxibenzaldehído. Sistema de elución: Hex:AcOEt / 8:2.

Por otra parte, el análisis por cromatografía líquida de alta resolución del extracto de acetato de etilo (Figura 10) mostró la identificación de los compuestos mayoritarios, los cuales poseen tiempos de retención de 26.35 min (UV, λ_{nm} = 215.7, 275.7, 332.7 nm) y 28.74 min (UV, λ_{nm} = 216.9, 276.9, 329.1 nm). Además, en el análisis de HPLC del extracto metanólico (Figura 11) se identificó la presencia de cuatro compuestos, con un tiempo de retención en 8.70 min (UV, λ_{nm} = 201.7, 271, 332.7 nm), 8.98 min (UV, λ_{nm} = 201.7, 256.9, 354.1 nm), el cual presentó un comportamiento cromatográfico similar al glucósido de quercetina que fue empleado como estándar para la identificación, 9.21 min (UV, λ_{nm} = 194.6, 266.3, 351.7 nm) que presentó un comportamiento cromatográfico similar al glucósido de canferol, utilizado como estándar para la identificación y 9.33 min (UV, λ_{nm} =201.7, 266.3, 289.9, 343.4 nm). Sin embargo, es necesario realizar estudios más precisos que permitan identificar los compuestos presentes en los extractos.

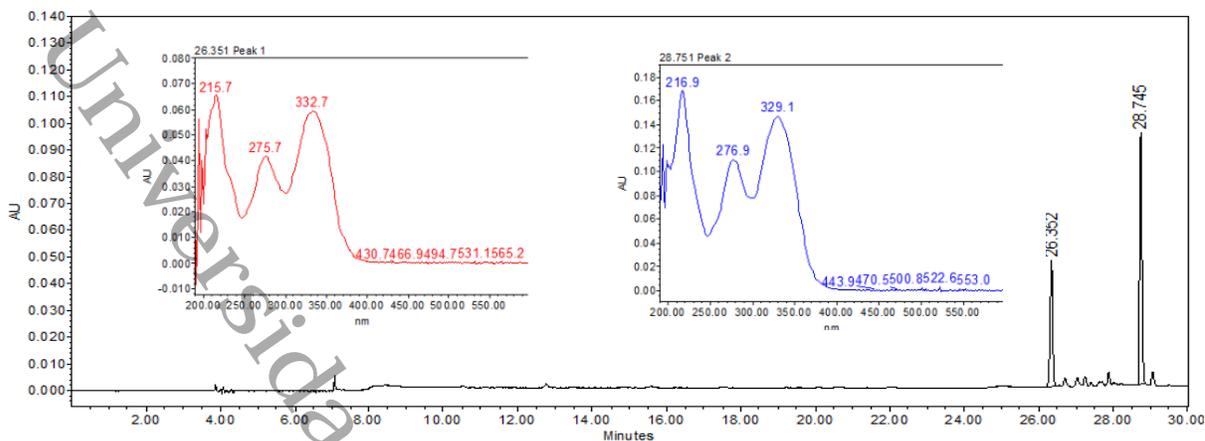


Figura 10. Cromatograma de HPLC y espectros de UV a 350 nm, del extracto de acetato de etilo de la hoja de *Montanoa tomentosa*.

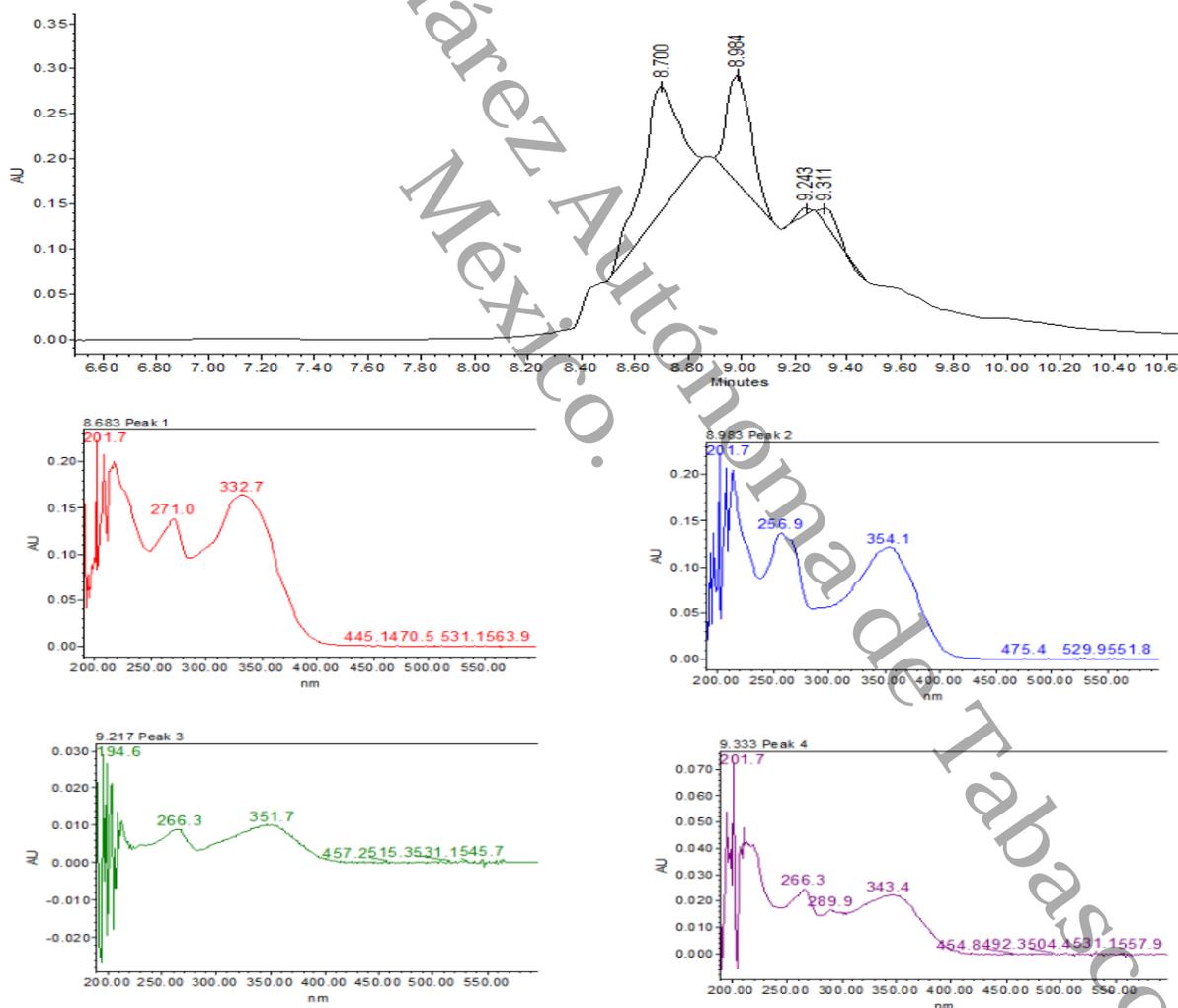
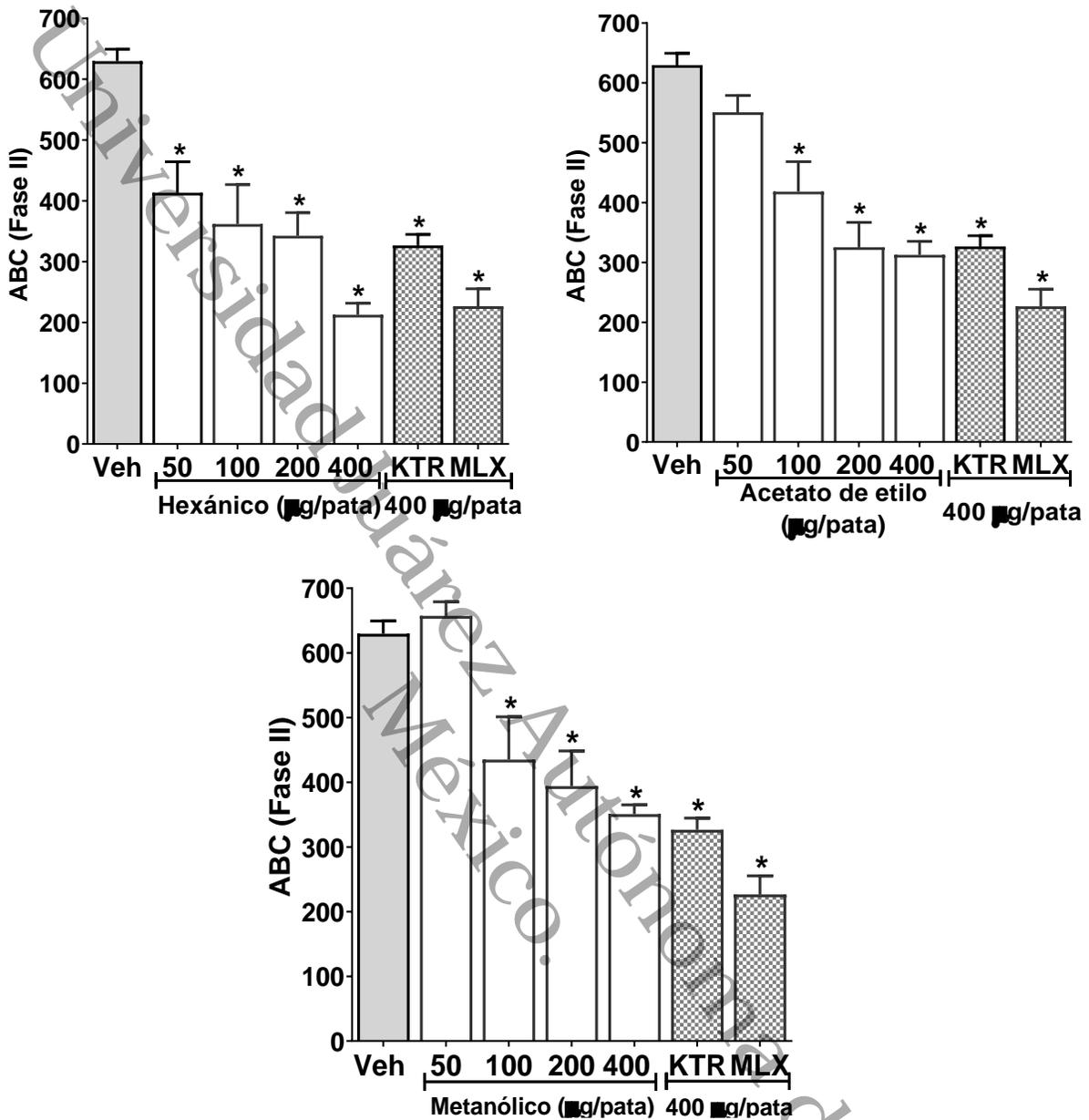


Figura 11. Cromatograma de HPLC y espectros de UV a 350 nm del extracto metanólico de la hoja de *Montanoa tomentosa*.

8.3. Evaluación del efecto antinociceptivo de los extractos obtenidos de la hoja de *Montanoa tomentosa*

El modelo de nocicepción inducido por formalina puede discriminar entre el dolor central y el dolor periférico. La primera fase (5-10 min) se genera en la periferia por medio de la activación de neuronas nociceptivas por la acción directa de la formalina, mientras que la segunda fase (15-50 min) se debe a un proceso inflamatorio local, que ocurre por medio de la activación de neuronas centrales en la médula espinal, lo que hace del mismo, un magnífico modelo animal de dolor relacionado con la inflamación, es decir, el dolor postraumático o postquirúrgico (Gonzalez-Darder, 2000). En ese sentido, en el modelo se observó un aumento del retiro espontáneo durante la primera fase, con respecto a la segunda fase. Sin embargo, la administración de los extractos de *Montanoa tomentosa* mostró una disminución de la nocicepción durante la fase II del modelo, mostrando una protección frente al dolor inflamatorio.

La Gráfica 1 muestra que la administración del extracto hexánico disminuyó el área bajo la curva (ABC) en un intervalo de tiempo de 60 minutos, esto en cada una de las dosis evaluadas (50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/pata}$), mostrando una diferencia significativa con respecto al vehículo, siendo la dosis de 400 $\mu\text{g/pata}$ la que produjo un mayor efecto, similar al obtenido por meloxicam a la misma dosis de 400 $\mu\text{g/pata}$. Por otra parte, los extractos de acetato de etilo y metanol disminuyeron la nocicepción en las dosis de 100, 200 y 400 $\mu\text{g/pata}$, significativamente diferente con respecto al vehículo, siendo la dosis de 400 $\mu\text{g/pata}$ la que obtuvo un mayor efecto, similar al obtenido por ketorolaco a la misma dosis de 400 $\mu\text{g/pata}$.



Gráfica 1. Efecto de la administración de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico sobre el comportamiento nociceptivo inducido por formalina durante la fase II. Ketorolaco (KTR, 400 µg/pata), meloxicam (MLX, 400 µg/pata). Cada barra representa el promedio ± el error estándar de 6 experimentos independientes. * $p < 0.05$ significativamente diferente en comparación con el vehículo. Análisis de una vía ANOVA, seguida de un estudio de Tukey (comparaciones entre grupos).

Con respecto a lo observado en la Gráfica 1, se calculó el porcentaje de antinocicepción a partir del ABC de la dosis de 400 µg/pata de cada tratamiento (Tabla 3), esto para conocer la magnitud del efecto antinociceptivo.

Tabla 3. Porcentaje de antinocicepción a 400 µg/pata

% Antinocicepción (400 µg/pata)				
Extracto Hexánico	Extracto de Acetato de etilo	Extracto Metanólico	Ketorolaco	Meloxicam
66.3 ± 3.0*	52.5 ± 4.7**	46.9 ± 3.4**	49.1 ± 2.9	64.3 ± 4.5

Cada determinación representa el promedio ± el error estándar de 6 animales. *p<0.05 contra ketorolaco, **p<0.05 contra meloxicam, determinado mediante análisis de una vía ANOVA, seguida de un estudio de Tukey.

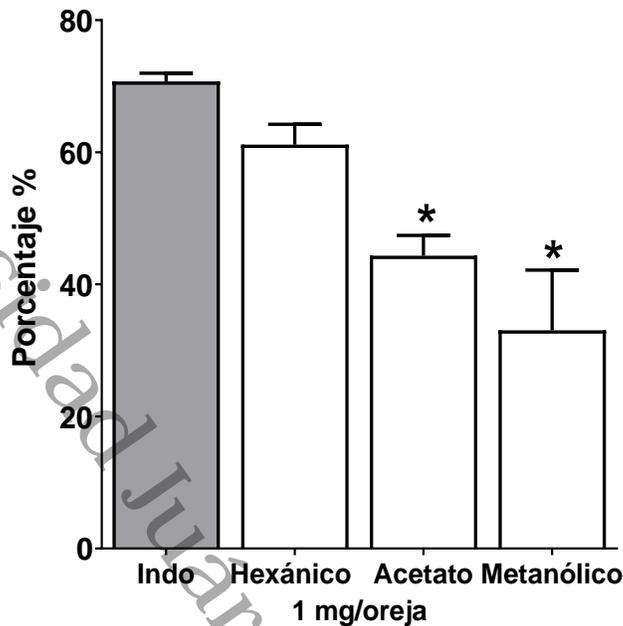
De acuerdo con el porcentaje de antinocicepción (Tabla 3), los extractos de acetato de etilo y metanol mostraron potencia antinociceptiva (52.5 % y 46.9 %, respectivamente), presentando un resultado similar al mostrado por el ketorolaco (49.1 %), sin mostrar diferencia. Sin embargo, el extracto hexánico mostró una mayor actividad antinociceptiva (66.3 %), siendo similar a lo mostrado por meloxicam (64.3 %) sin mostrar diferencia. Lo anterior sugiere que efecto obtenido por el extracto hexánico es probable debido a la presencia de compuestos de baja polaridad y potencialmente inhibiendo la acción de COX-2 (preferente para meloxicam), disminuyendo la síntesis de mediadores del dolor (Feldman *et al.*, 2000). Estos resultados constituyen un primer reporte sobre el efecto antinociceptivo de las hojas de *Montanoa tomentosa*, corroborando su uso en el tratamiento del dolor en mujeres después de la inducción del parto. Sin embargo, se han realizado estudios en extractos de diferentes plantas, por ejemplo, se probaron extractos y fracciones de las partes aéreas de *Sideritis candicans* Ait. var. *Eriocéphala*, demostrando su potencial actividad antinociceptiva en el modelo de retorcimiento inducido por ácido acético, los autores sugieren que el efecto podría estar relacionado a la presencia de fitoesteroles, derivados de alfa y beta amirina y diterpenos de tipo *ent*-kaureno de esta especie (Hernández-Pérez *et al.*, 2004). Los resultados indicaron que los extractos analizados mostraron actividad

antinociceptiva porque fueron capaces de reducir la respuesta nociceptiva a los estímulos químicos del dolor, como en la prueba de retorcimiento inducida por ácido acético. También, se ha reportado la presencia de triterpenos como la β -amirina, la cual ha demostrado tener efecto antinociceptivo de manera predominante durante la fase II (respuesta inflamatoria) del modelo de formalina, mecanismo probable debido a que interfiere con la vía de la proteína cinasa C (PKC) y de la vía de la proteína cinasa A (PKA) (Aragao, *et al.*, 2008. Otuki, *et al.*, 2005).

8.4. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos obtenidos de la hoja de *Montanoa tomentosa*

Para determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos de *Montanoa tomentosa* se utilizó el modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA. En el caso del TPA, una sola aplicación en la oreja del ratón genera una respuesta edematosa que alcanza su máximo nivel a las 6 horas. En este modelo, el edema está asociado con un incremento en el contenido de prostaglandina E₂ (PGE₂) y el leucotrieno B₄ (LTB₄), el cual promueve la activación de la ruta MAPK, induciendo la liberación de citocinas proinflamatorias como la interleucina (IL)-1, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-8, la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 β y la generación de ROS (Ascari *et al.*, 2019). Por otra parte, se sabe que se induce un incremento de eicosanoides, activación de la proteína cinasa C (PKC), y de fosfolipasa A2, que resulta en la liberación de ácido araquidónico, inducción de la ciclooxigenasa y activación de la lipooxigenasa (Wang *et al.*, 2001. Kast *et al.*, 1993. Sánchez *et al.*, 1999). En este estudio se utilizó indometacina como control positivo antiinflamatorio, el cual inhibe a la ciclooxigenasa, disminuyendo la síntesis de agentes inflamatorios y, por lo tanto, causando una disminución del edema.

Los resultados obtenidos mostraron que los tratamientos a una dosis de 1 mg/oreja de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanol de la hoja de *Montanoa tomentosa* disminuyeron el edema inducido por la aplicación tópica del TPA en un 61.1 ± 3.0 %, 44.3 ± 3.0 %, 33.0 ± 9.1 %, con respecto al grupo al que se le administró indometacina 70.7 ± 1.2 % (Gráfica 2). Sin embargo, el extracto hexánico fue el que presentó una mayor actividad antiinflamatoria, similar al grupo que recibió indometacina, sin mostrar una diferencia significativa.



Gráfica 2. Efecto de la administración de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico sobre la disminución del edema en oreja de ratón inducido por TPA, a una dosis de 1 mg/oreja. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 6 experimentos independientes. * $p < 0.05$ significativamente diferente en comparación con el grupo de indometacina (1 mg/oreja). Análisis de una vía ANOVA, seguida de un estudio de Tukey.

Estos datos sugieren que el extracto hexánico presenta una eficacia similar al de indometacina, el cual es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa, evitando la activación de la vía del ácido araquidónico, la cual lleva a la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por su siglas en inglés) induciendo a la producción de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, posteriormente, desencadenando una respuesta inflamatoria que conlleva a una vasoconstricción, vasodilatación, agregación plaquetaria, entre otros eventos, promoviendo la formación del edema (Kim *et al.*, 2010). Estos resultados constituyen un primer reporte sobre la actividad antiinflamatoria de *Montanoa tomentosa*. Por otra parte, debido a la presencia de compuestos del tipo terpeno y ácidos grasos en un extracto no polar, se podría validar el uso de esta especie como un agente antiinflamatorio. En ese sentido,

muchas preparaciones a base de plantas medicinales, por ejemplo, plantas de la familia *Asteraceae*, se han utilizado como remedios caseros para diversas afecciones inflamatorias, como la artritis reumatoide, el asma, la psoriasis y la migraña, proponiendo que los metabolitos causantes de este efecto pueden ser lactonas sesquiterpénicas ya que se ha reportado, son inhibidores potentes específicos de la vía NF- κ B. Además de mencionar a compuestos del tipo terpeno, incluidos, compuestos del tipo di- y triterpenos, los cuales tienen efectos inhibitorios sobre el sistema NF- κ B (Nam, 2006). En ese sentido, un estudio realizado por Villa-de la Torre *et al.* (2017), demostró la actividad antiinflamatoria del extracto no polar de *Montanoa grandiflora*, esto en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA, los autores sugieren su mecanismo de acción mediante la inhibición en la producción de Óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés). Por otra parte, otras especies de la familia *Asteraceae*, contienen diferentes terpenos, como el estigmasterol, el cual se ha demostrado, puede reducir los mediadores proinflamatorios como el NO y PGE₂, esto probado en un modelo *in vitro* en macrófagos murinos RAW 264.7 (Pandith *et al.*, 2013) y el acetato de taraxasterol, el cual se ha demostrado, reduce la inflamación en modelos *in vivo* como el edema de oreja de ratón inducido por TPA (Pérez-García *et al.*, 2005). Además de presentar triterpenos como α , β -sitosterol, β -amirina y lupeol que en diversos modelos de ensayo demostraron una alta actividad antiinflamatoria (Melo *et al.*, 2011. Valerio *et al.*, 2011. Sánchez-Burgosa *et al.*, 2015).

8.5. Separación por cromatografía en columna abierta del extracto bioactivo

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación antinociceptiva y antiinflamatoria de los extractos de *Montanoa tomentosa*, el extracto hexánico fue el que resultó más activo. En ese sentido, se sometió a separación química por medio de cromatografía de columna abierta empleando 30 g del extracto, el cual se adsorbió en 40 g de sílica gel fase normal y se compactó en una columna de vidrio (600 x 35 mm) en 260 g de sílica gel fase normal (Figura 12).

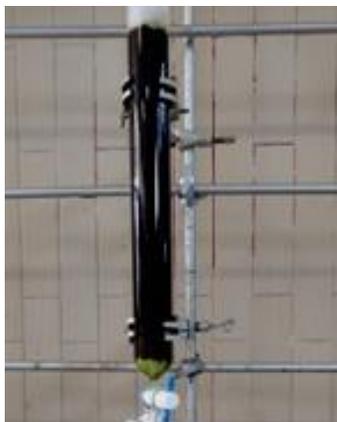


Figura 12. Cromatografía en columna abierta CCA

El proceso se inició con un sistema de elusión de 100 % *n*-hexano, aumentando la polaridad de la fase móvil adicionando 5 % de AcOEt hasta llegar a un sistema de elusión de 1:1 *n*-hexano:AcOEt. Finalmente, se realizó un lavado con 100 % AcOEt para obtener la parte más polar del extracto. Se obtuvieron un total de 36 fracciones, cada una de 300 mL, las cuales se agruparon con base en su contenido químico en CCF, resultando en un total de 11 fracciones (Figura 13) que fueron concentradas al vacío.

El revelado químico con Komarovsky permitió observar marcas de color morado, además de marcas de colores azul, verde y amarillo, características que indican la presencia de terpenos.

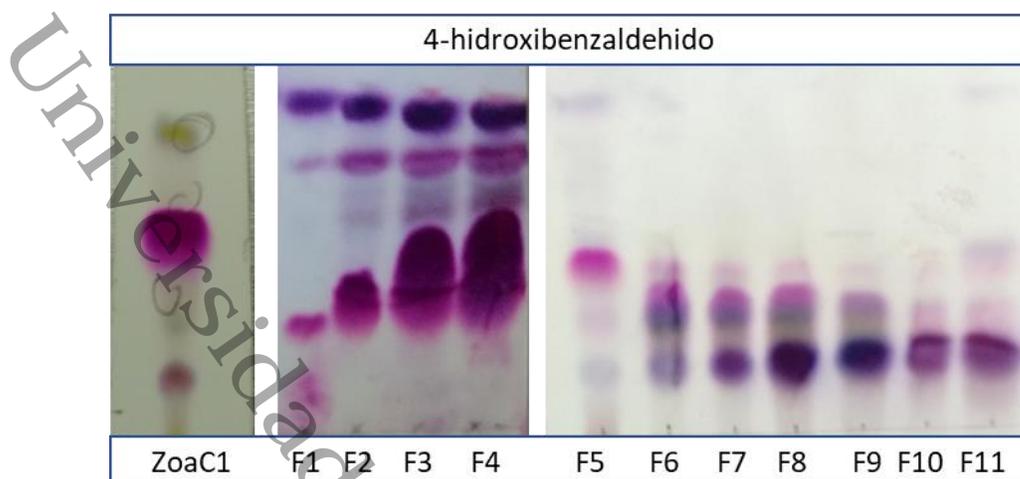


Figura 13. CCF de la composición química de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento del extracto hexánico. Fase Normal/ sistema de elución: 90:10 Hex:AcOEt / revelador: Komarovsky (4-hidroxibenzaldehído).

Las fracciones 1-5 fueron agrupadas para obtener la fracción ZoaC2 (5 g) la cual se disolvió en *n*-hexano. Posteriormente, se adsorbió en gel de sílice fase normal (10 g) y se aplicó a una columna de gel de sílice fase normal (30 g), se empleó un gradiente de *n*-hexano/AcOEt como fase móvil, recogiendo 14 fracciones de 10 ml cada una. Estas fracciones se concentraron en un evaporador rotativo a presión reducida y se agruparon de acuerdo con su similitud química observada por CCF, obteniéndose un total de 6 fracciones: ZoaC2-F1 (1.3 g), ZoaC2-F2 (0.3 g), ZoaC2-F3 (0.1 gr), ZoaC2-F4 (0.4 g), ZoaC2-F5 (0.2 g) y ZoaC2F6 (0.8g) (Figura 14).

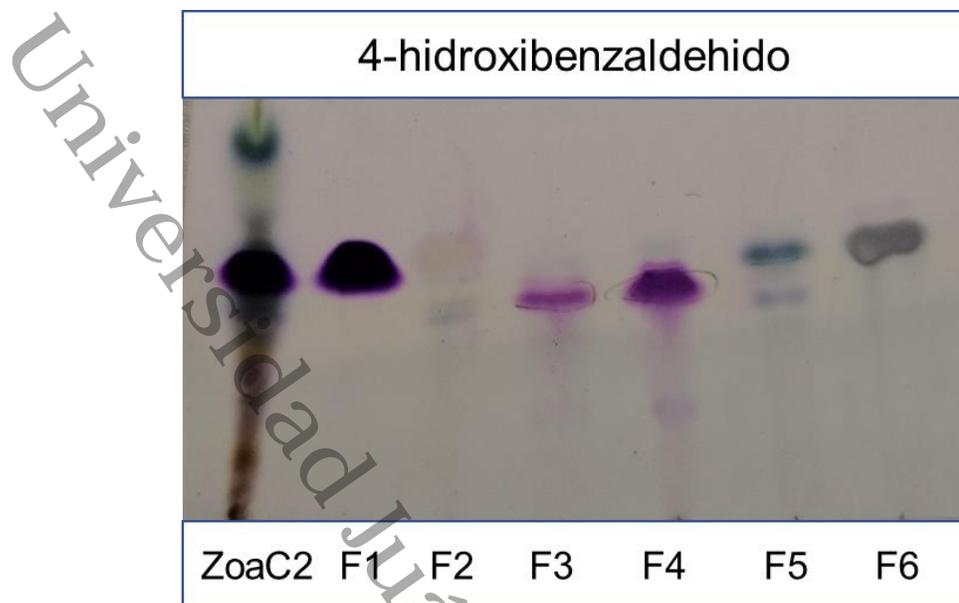


Figura 14. CCF de la composición química de las fracciones obtenidas a partir de la fracción ZoaC2. Fase Normal/ sistema de elución: 90:10 Hex:AcOEt/revelador: Komarovsky (4-hidroxibenzaldehído).

La selección de las fracciones que se someterían a un análisis por Resonancia Magnética Nuclear se realizó de manera aleatoria. En ese sentido, se emplearon las fracciones ZoaC2F-1, 2 y 3.

8.6. Identificación de los compuestos obtenidos de *Montanoa tomentosa*

El compuesto **1** (58 mg) se obtuvo como cristales incoloros, los cuales cristalizaron en una mezcla de MeOH/Hexano 1:1 a partir de la fracción ZoaC2F1. En el análisis de RMN- ^1H de **1** (Figura 15) se mostraron dos señales a frecuencias bajas: $\delta=1.23$ (3H, s, H-18) y $\delta=1.02$ (3H, s, H-20) señales características de CH_3 . Por otro lado, en la zona de frecuencias altas se observó una señal correspondiente a un protón olefínico en $\delta=5.24$ (1H, t, $J=3.3, 3.3$, H-11) y dos protones olefínicos geminales, $\delta=4.90$ (1H, d, $J=1.1$, H-17a) y $\delta=4.80$ (2H, s, H-17b), estos resultados sugieren que se trata del ácido ent-kaura-9 (11), 16-dien-19-oico, conocido como ácido grandiflorénico.

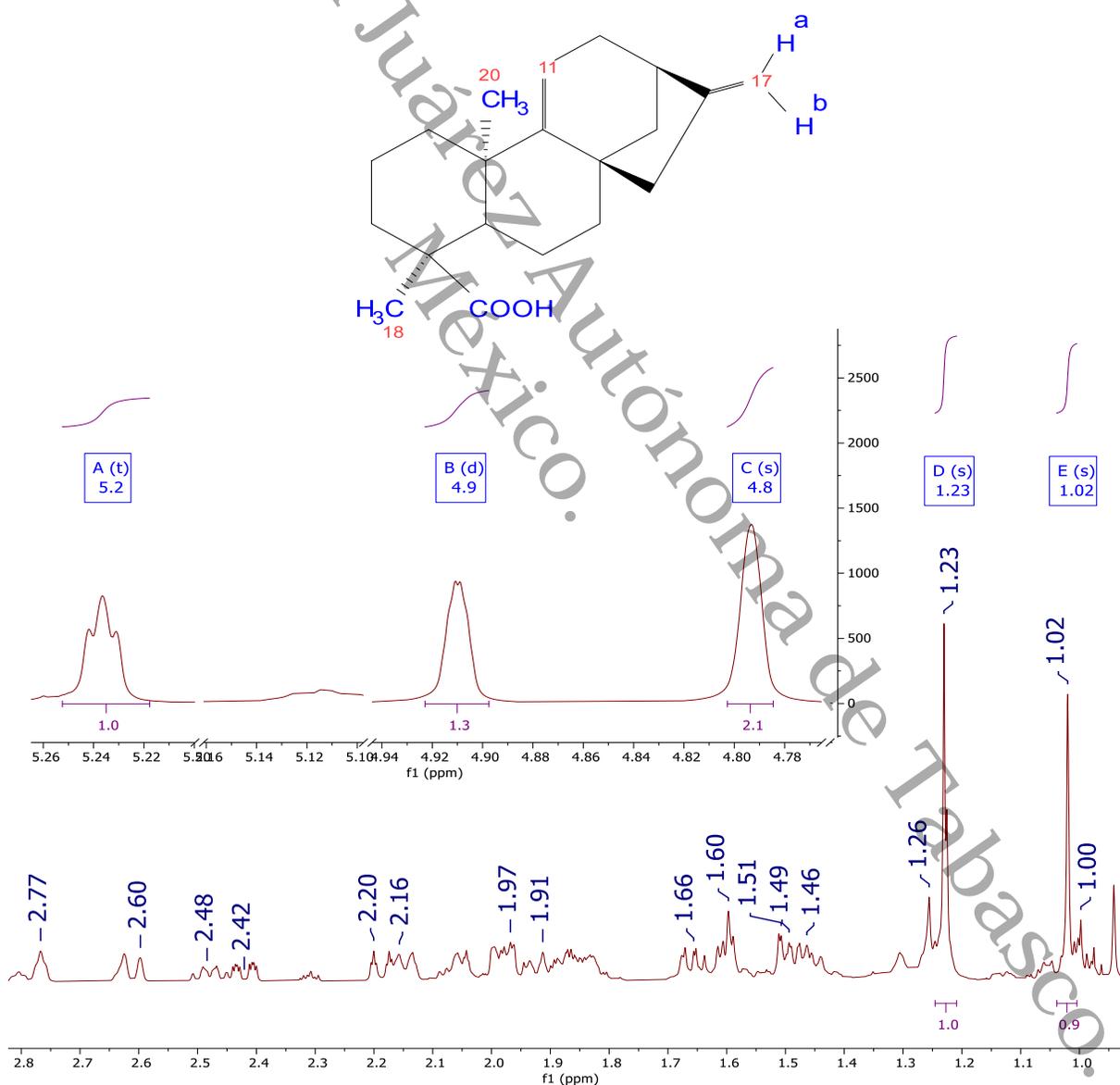


Figura 15. Espectro de RMN- ^1H (600 MHz) en CDCl_3 , t.a., del compuesto **1**.

Por otra parte, en el experimento de RMN-¹³C (Figura 16) se identificaron señales a frecuencias bajas que corresponden a metilos $\delta = 28.4$ ppm (C-18) y $\delta = 23.7$ ppm (C-20), de igual manera, a frecuencias altas, se identificaron carbonos unidos a dobles enlace en $\delta = 156.1$ (C-9), $\delta = 115.0$ ppm (C-11), $\delta = 158.7$ ppm (C.16) y $\delta = 105.6$ ppm (C-17). Asimismo, estas señales en conjunto con el carbonilo ubicado en $\delta = 184$ ppm (C-19) y comparando con los datos reportados por Reynolds, W. *et al.*, (1984), se confirma que se trata del ácido ent-kaura-9 (11), 16-dien-19-oico (Tabla 4).

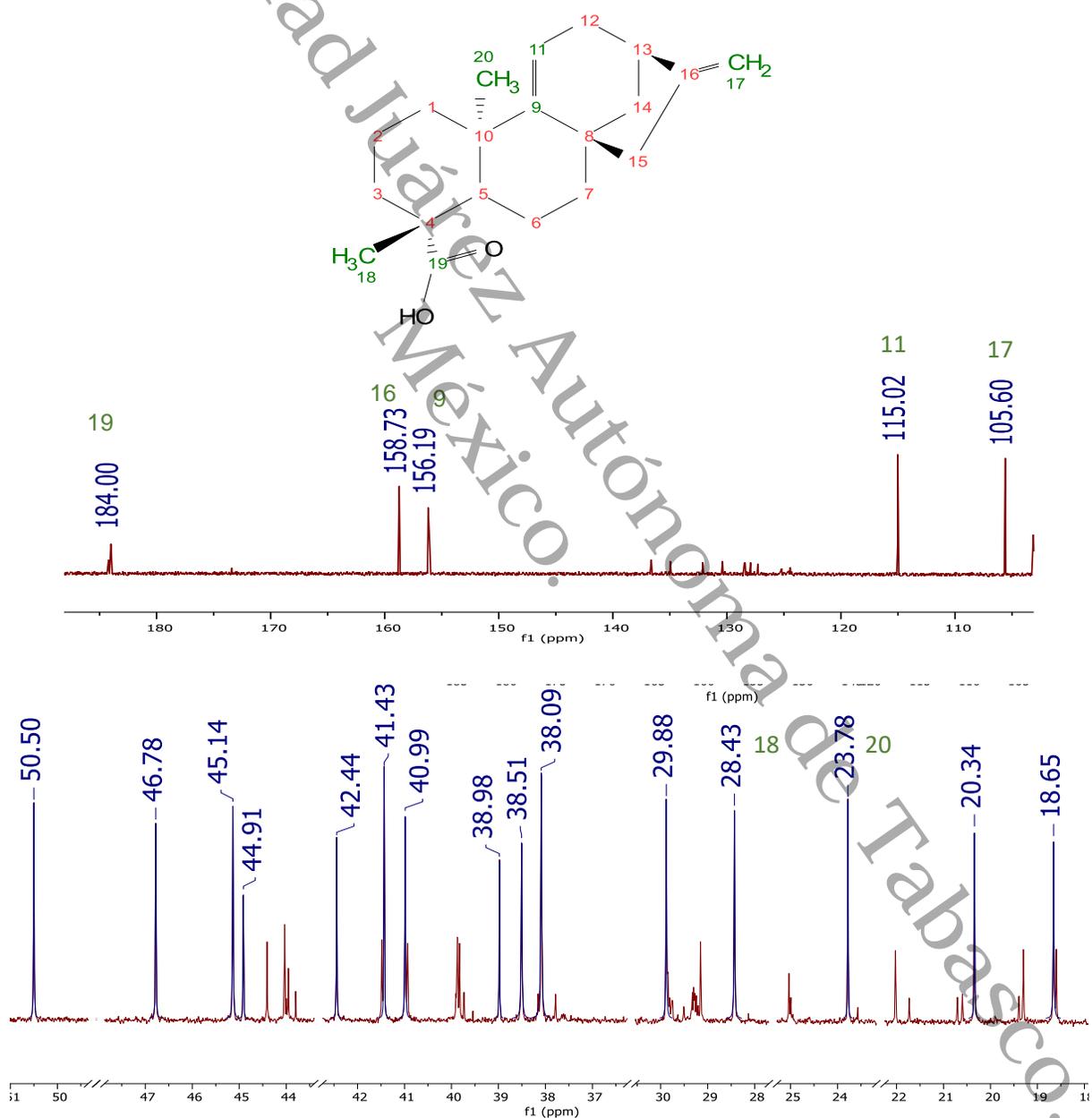


Figura 16. Espectro de RMN-¹³C (150 MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto 1.

En cuanto a los experimentos bidimensionales, nos permitió establecer las correlaciones entre protones y carbonos de la molécula. En ese sentido, análisis de espectroscopía de correlaciones (COSY), mostró acoplamiento entre los protones 13 y 14a, además, de los protones 11 y 12a, también, de los protones 15 y 17a en el compuesto **1** (Figura 17).

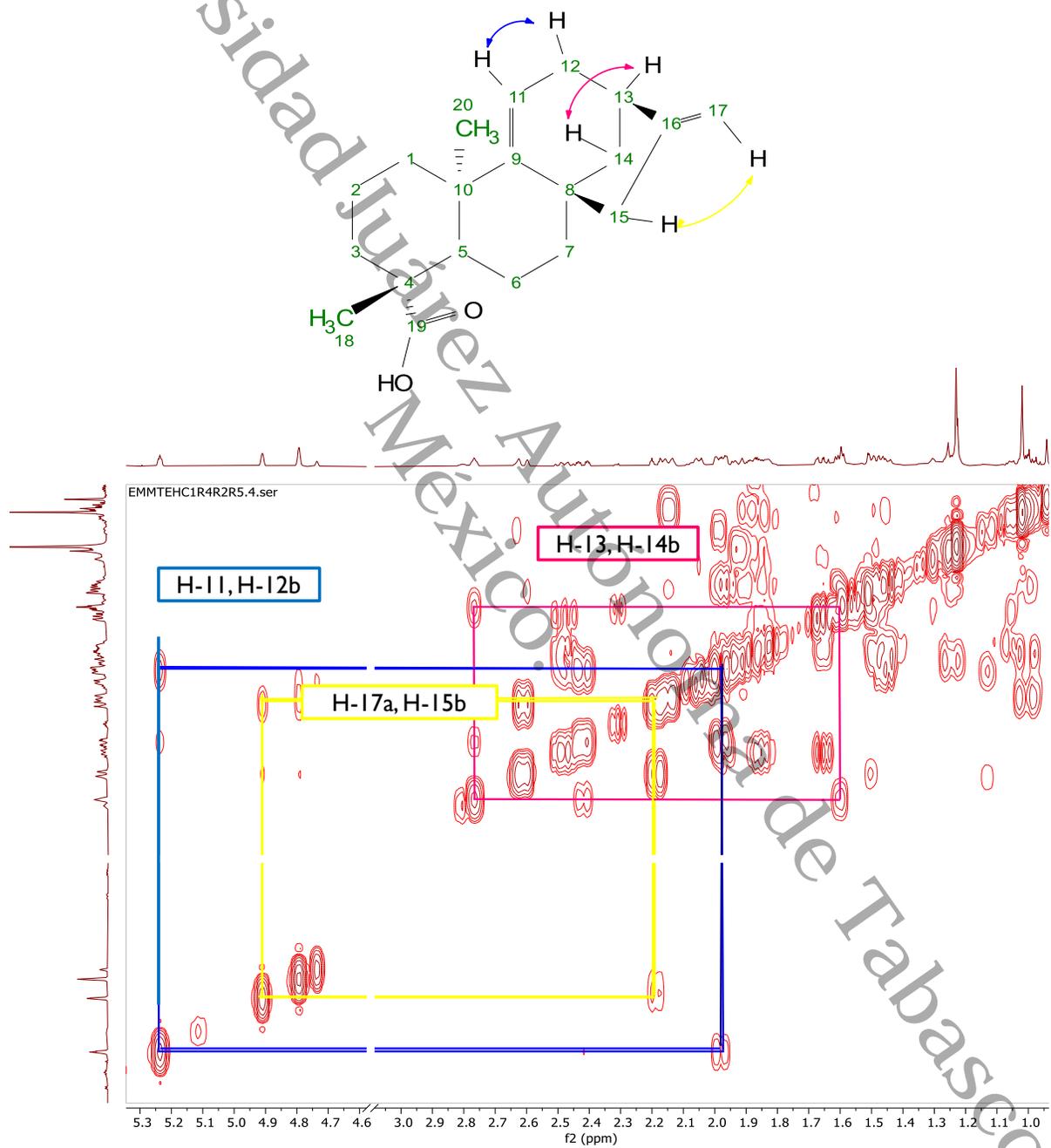


Figura 17. Experimento COSY (¹H - ¹H) (600 MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto **1**.

Por otra parte, en el análisis de correlación heteronuclear de un único cuanto (HSQC) se observó la correcta correlación entre las señales de carbonos y protones asignados en las posiciones 46.7, 1.6 (CH-5), 114.4, 5.24 (CH-11), 41.4, 2.7 (CH-13), 105.6, 4.9 – b4.8 (CH₂-17), 28.2, 1.2 (CH₃-18) y 23.6, 1.0 (CH₃-20) (Figura 18).

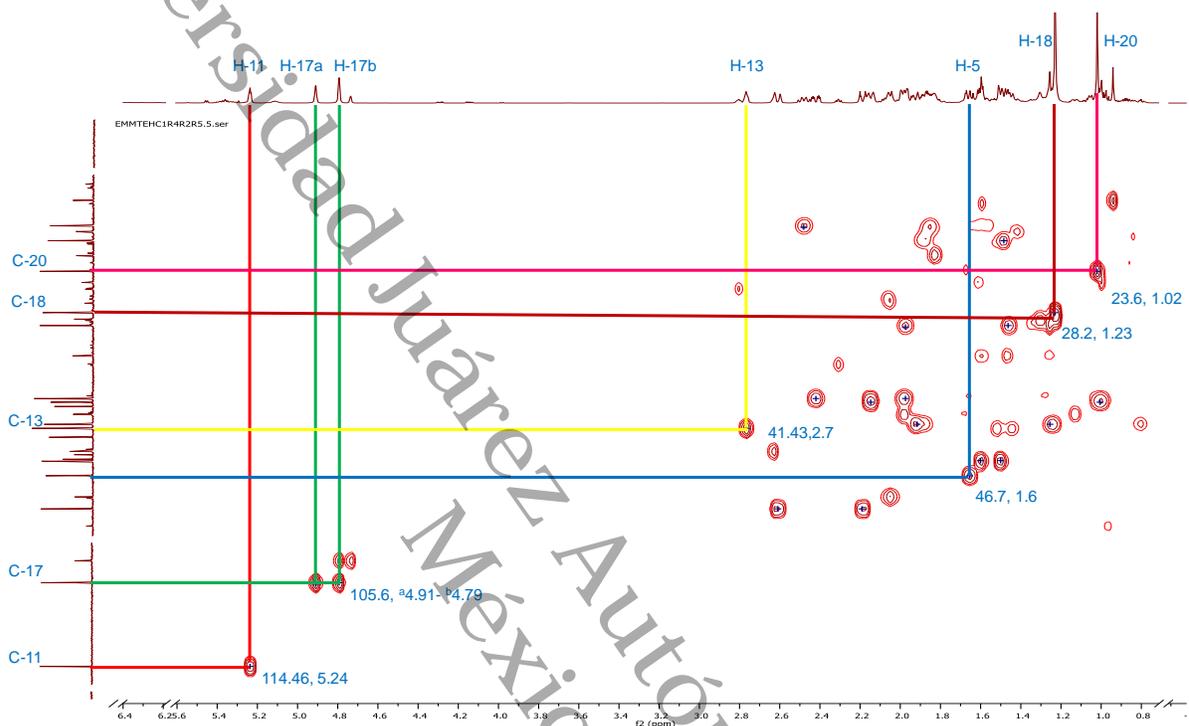


Figura 18. Experimento HSQC (¹H - ¹³C) (600 MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto 1.

En la Tabla 4 se presenta un resumen de la elucidación de las señales de resonancia magnética nuclear del compuesto 1.

Tabla 4. Datos espectroscópicos RMN-¹H (600 MHz) y RMN-¹³C (150 MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto 1.

Posición	δ^1_H (δ , J en Hz) Experimental	δ^1_H (ppm) Referencia*	δ^{13}_C (ppm) Experimental	δ^{13}_C (ppm) Referencia*
1a	1.91 (1H, m)	1.31	40.99	40.75
1b	1.26 (1H, m)	2.04		
2	1.49 (1H, m)	1.90	20.18	20.13
3a	1.0 (1H, m)	1.05	38.35	38.21
3b	2.1 (1H, m)	2.36		
4	-	-	44.91	44.74
5	1.6 (1H, m)	2.02	46.7	46.61
6	2.48 (2H, m)	2.43	18.65	18.44
7a	1.46 (1H, m)	1.49	29.88	29.67
7b	1.98 (1H, m)	1.67		
8	-	-	42.44	42.26
9	-	-	156.1	155.93
10	-	-	38.98	38.80
11	5.2 (1H, t, 3.3, 3.3 Hz)	5.20	115.02	114.89
12a	2.4 (1H, m)	2.38	37.95	37.91
12b	1.9 (1H, m)			
13	2.7 (1H, m)	2.75	41.43	41.23
14a	1.5 (1H, m)	1.55	45.14	44.94
14b	1.6 (1H, m)			
15a	2.6 (1H, m)	2.91	50.5	50.29
15b	2.1 (1H, m)	2.58		
16	-		158.7	158.49
17a	4.9 (1H, d)	4.89	105.6	105.49
17b	4.8 (2H, s, br)	4.83		
18	1.23 (3H, s)	1.22	28.43	28.23
19	-	-	184.0	184.72
20	1.0 (3H, s)	0.98	23.78	23.59

*Reynolds *et al.*, (1984).

Con la finalidad de confirmar la presencia del ácido ent-kaura-9 (11), 16-dien-19-oico, se realizó un análisis de espectrometría de masas (Figura 19), mediante un espectrómetro de masas de triple cuádruplo TQD (Water, Milford, MA, USA) acoplado a un cromatógrafo líquido Acquity a través de una fuente de iones combinada de electropray-APCI Z-spray. Los resultados indican la presencia en el ion positivo EI-MS, el ion cuasimolecular, alcanzando su punto máximo a m/z 301 $[M + H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{28}O_2$, 300.44).

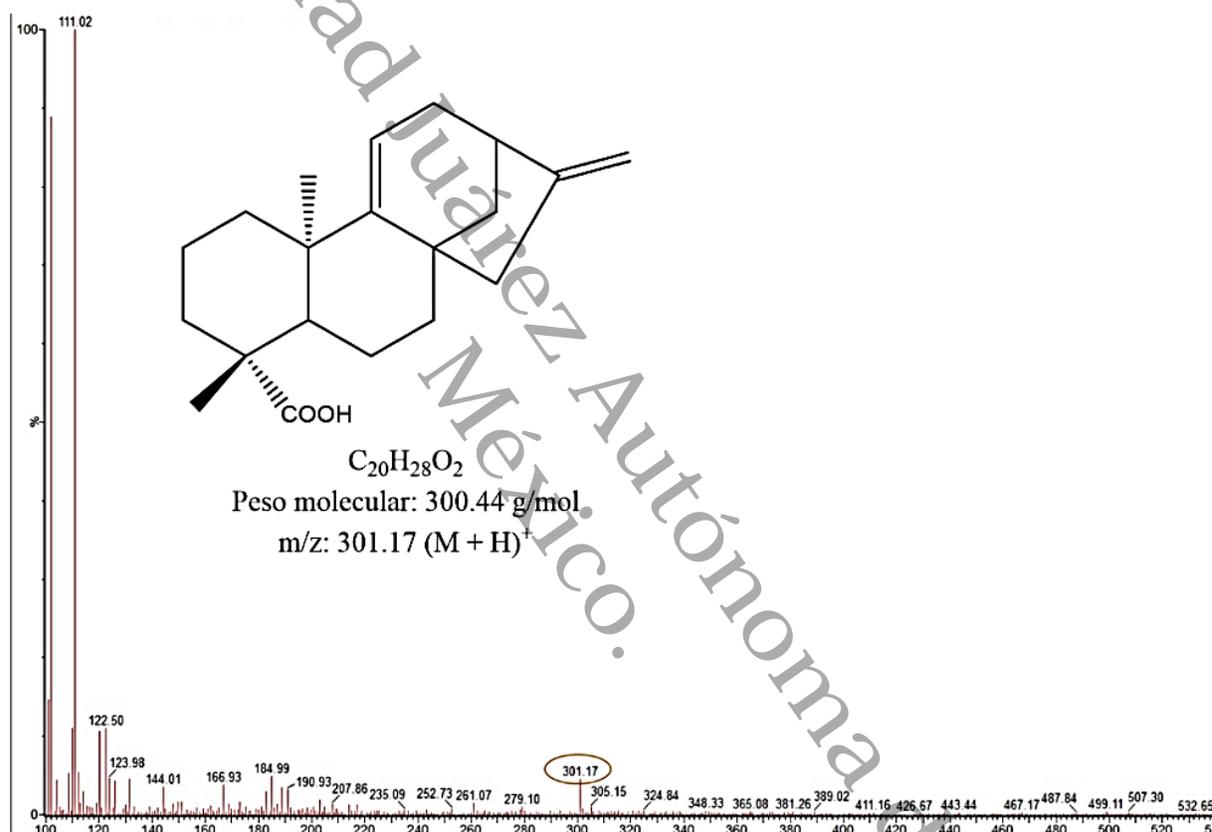


Figura 19. Espectrometría de masas del compuesto **1**, donde se muestra un pico máximo (301.17 m/z), presencia del ácido ent-kaura-9 (11), 16-dien-18-oico.

El compuesto **2** (42 mg) se obtuvo como un sólido blanco, a partir de la fracción ZoaC2F2. El análisis de RMN-¹H de **2** (Figura 20) mostró señales en la región de frecuencia alta a $\delta=4.61$ ppm (dd, $J= 2.2$, 1H) característica de un doble enlace exocíclico, además se mostraron señales a $\delta=2.44$ ppm, $\delta=2.19$ ppm y $\delta=2.09$ ppm, correspondientes a carbonos unidos al carbono de doble enlace, asimismo, se identificó una señal a $\delta=3.20$, que indica el acoplamiento de un protón con un metoxilo. Por otra parte, en la zona de frecuencias bajas, se identificaron señales correspondientes a siete metilos (CH₃) en $\delta=1.25$, $\delta=1.02$, $\delta= 0.97$, $\delta= 0.93$, $\delta= 0.85$ y $\delta=0.77$. Estos datos sugieren que se trata del taraxasterol.

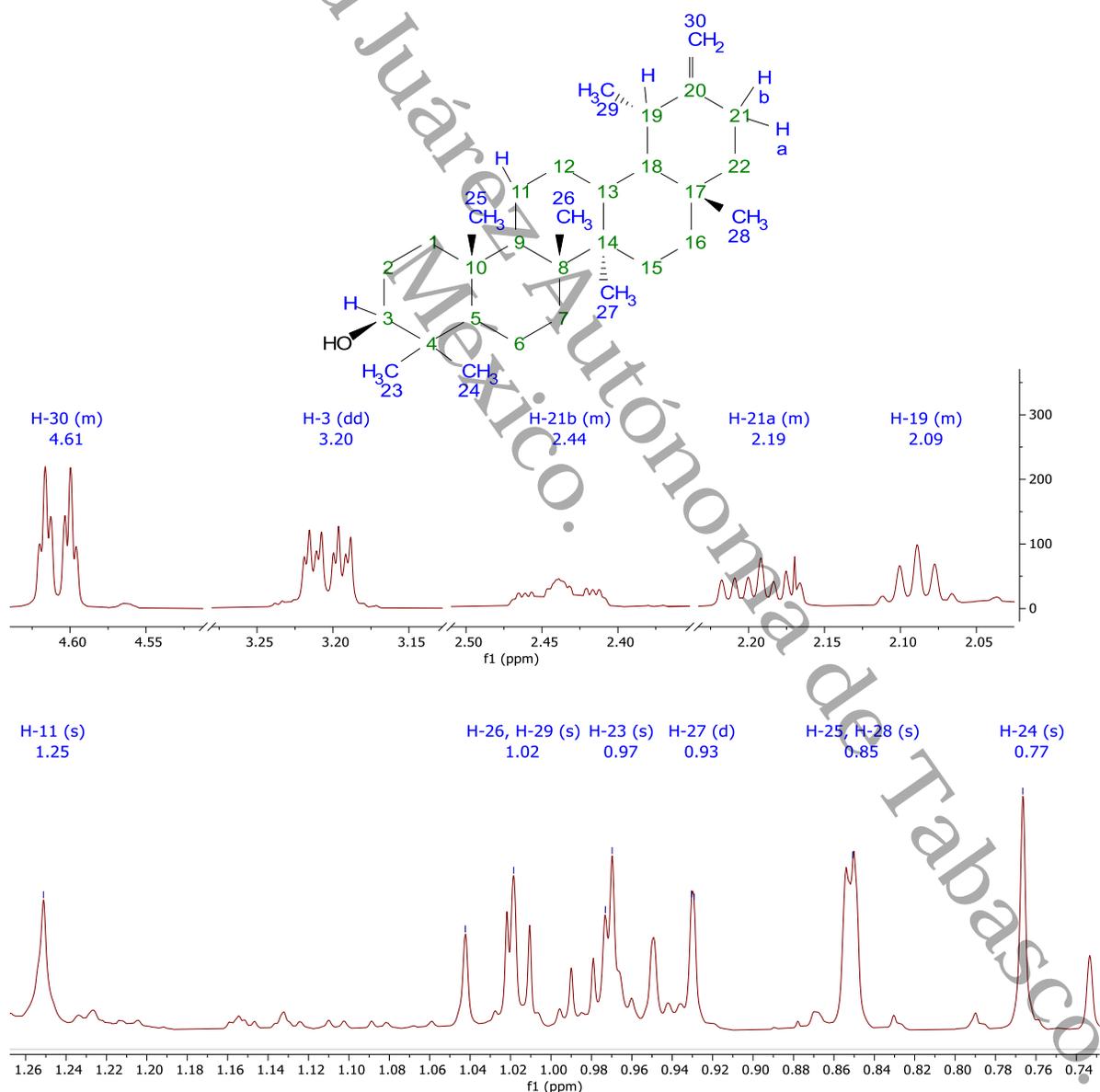


Figura 20. Espectro de RMN-¹H (600 MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto **2**

El experimento de RMN-¹³C (Figura 21) mostró señales en la región de frecuencias altas a $\delta=107.08$ (C-30) y $\delta=154.58$ (C-20) correspondientes al doble enlace exocíclico y se identificó una señal a $\delta= 78.9$ (C-3) confirmando la presencia de un metoxilo. Además, se identificaron una serie de señales entre $\delta= 18$ y 55 ppm de las cuales corresponde a C, CH y CH₂. También se identificaron siete señales que corresponden a los metilos que integran a la estructura del taraxasterol a $\delta=27.29$ (C-23), $\delta= 15.31$ (C-24), $\delta= 16.2$ (C-25), $\delta= 15.8$ (C-26), $\delta=14.7$ (C-27), $\delta= 19.4$ (C-28) y $\delta=25.4$ (C-29).

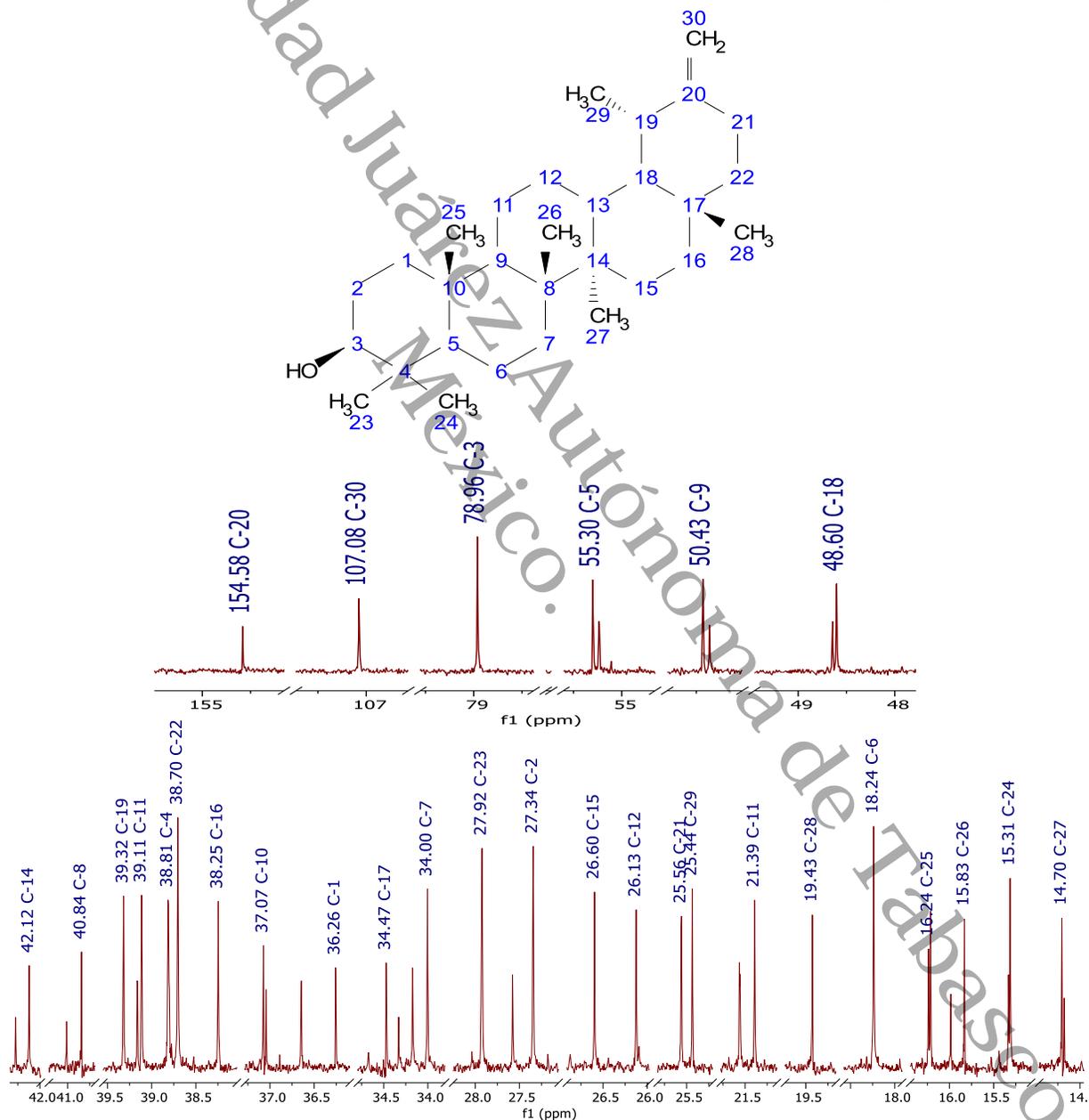


Figura 21. Espectro de RMN-¹³C (150 MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto 2

Comparando estos resultados con los reportados por Reynolds, W. *et al.*, (1986), se corrobora que se trata del taraxasterol (Tabla 5).

En cuanto a los experimentos bidimensionales, permitió establecer las correlaciones entre protones y carbonos de la molécula. En el análisis de espectroscopía de correlaciones (COSY) entre protones vecinales, se mostraron correlaciones entre H-3 - H-2 y H-19 - H-18 (Figura 22).

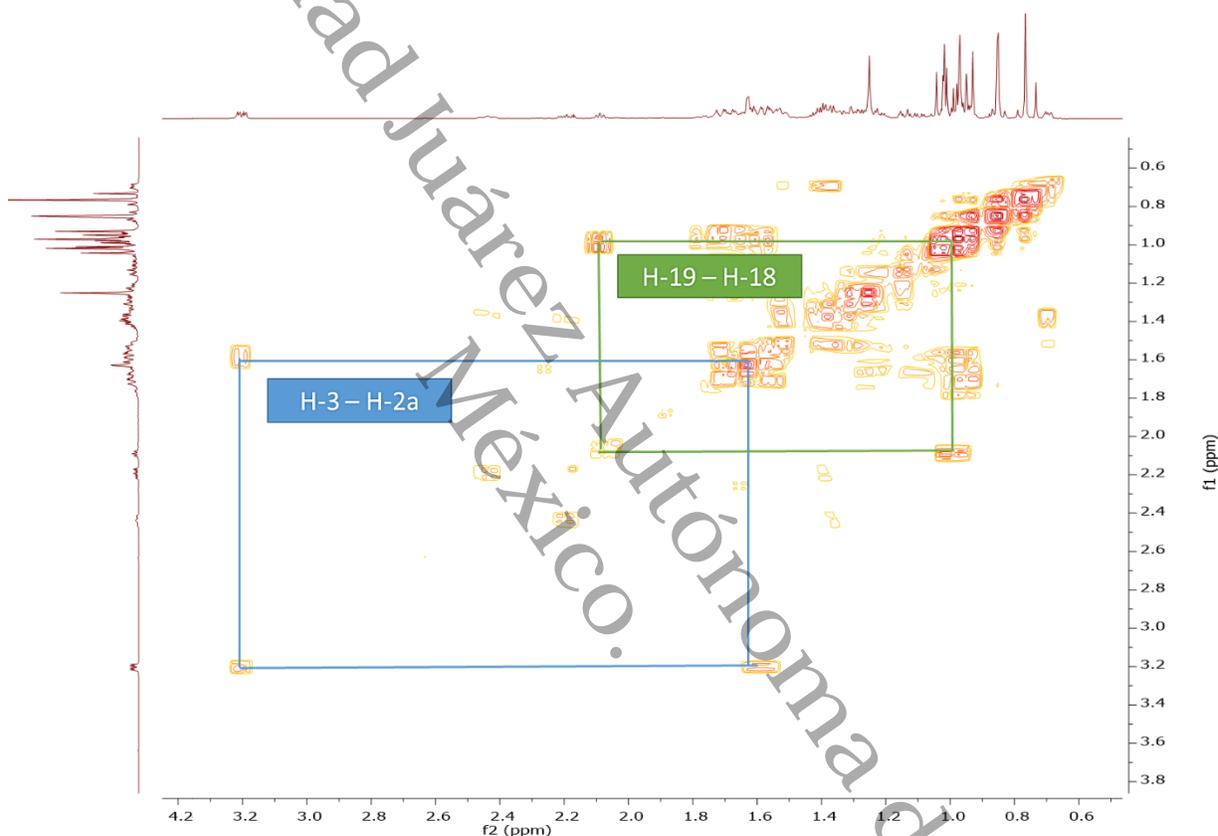


Figura 22. Experimento COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) (600 MHz) en CDCl_3 , t.a., del compuesto **2**.

En el análisis de correlación heteronuclear de un único cuanto (HSQC), se observó la correcta correlación entre las principales señales de carbonos y protones, asignados en las siguientes posiciones CH-30, CH-3, CH-19, CHa-21, (Figura 23a). Además, se asignaron las siguientes posiciones: CH-5, CHa-6, CH-9, CHa-11, CH-13, CH-18, CH-23, CH-25 y CH-26, que concuerdan con los carbonos unidos al menos a un hidrógeno de la estructura del taraxasterol (Figura 23b).

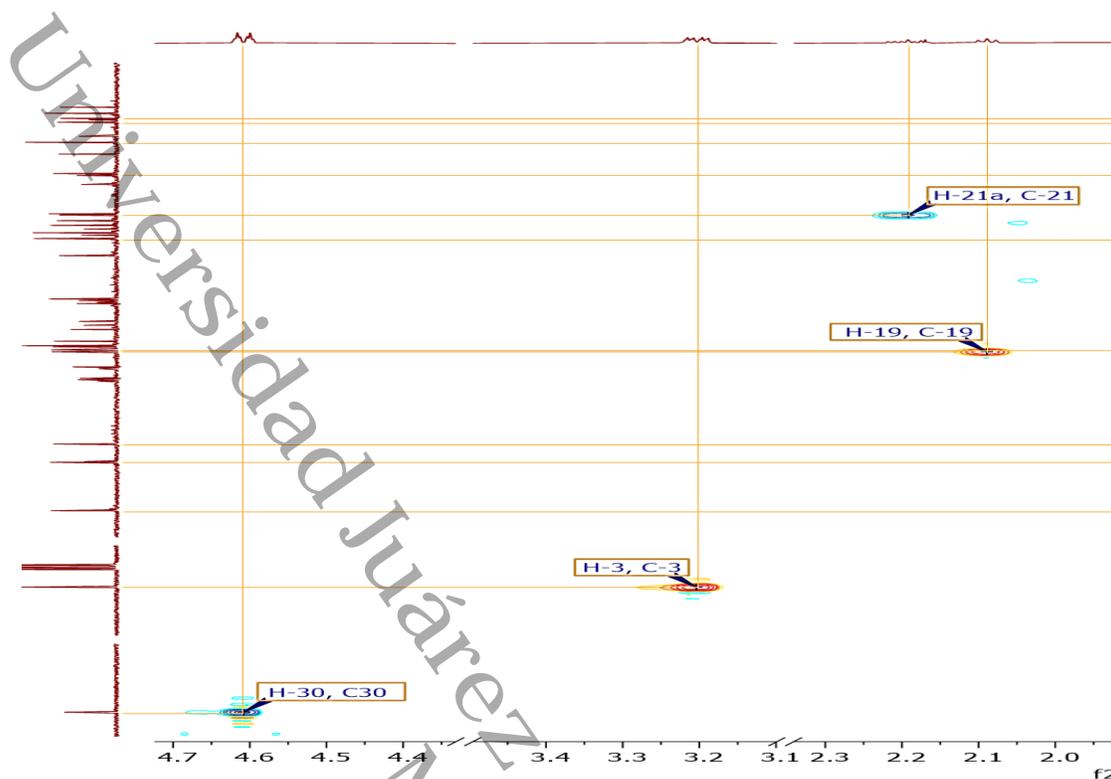


Figura 23a. Experimento HSQC (^1H - ^{13}C) (600 MHz) en CDCl_3 , t.a., del compuesto 2

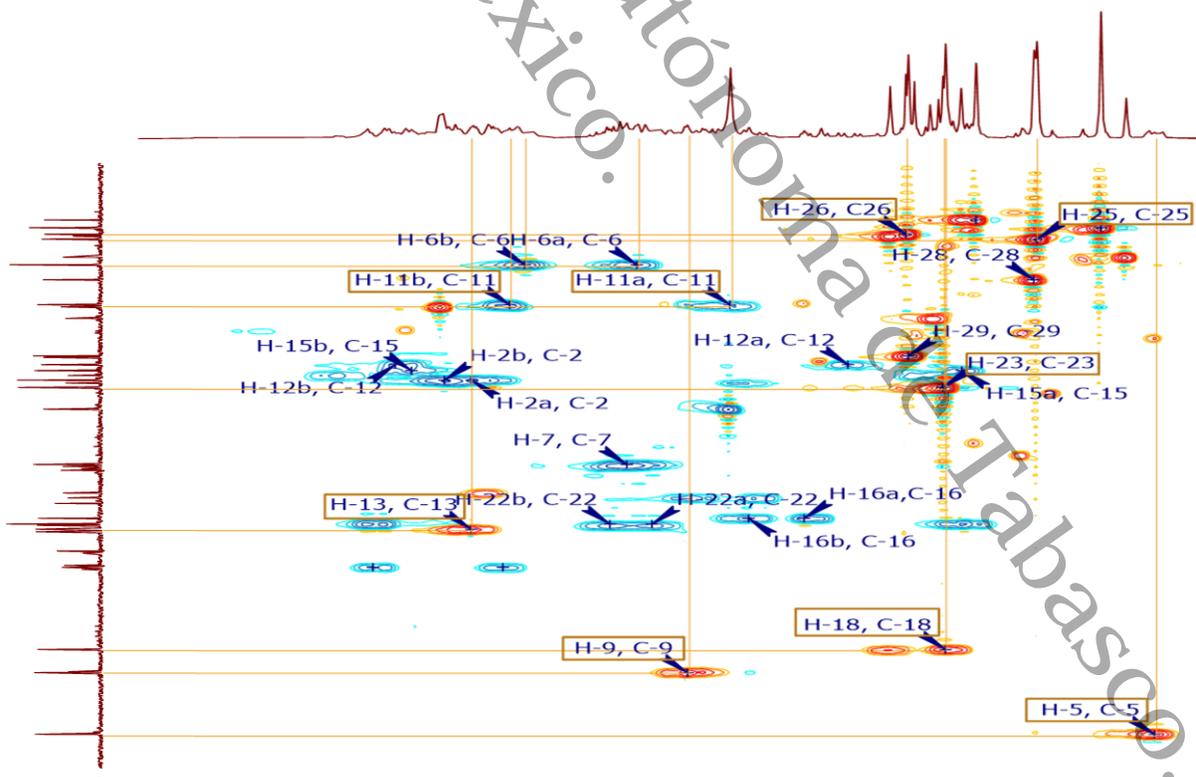


Figura 24b. Experimento HSQC (^1H - ^{13}C) (600 MHz) en CDCl_3 , t.a., del compuesto 2.

En el experimento de correlación heteronuclear a múltiples enlaces (HMBC) (Figura 24), se observó el acoplamiento a más de un enlace para el H-30 con C-19 y C21, para H-3 con C-4, C-23 y C-24, para H-21 con C-30 y C-20, para H-19 con C-13, C-18, C-20, C-21 y C-30, para H-12 con C-13, H-6 con C-5 y C-8, para H-16 con C-18, H-29 con C-20, H-23 con C-3 y H-24 con C-3, C-4, C-5 y C-23. Estas correlaciones coinciden con las correlaciones esperadas para el taraxasterol (Figura 25).

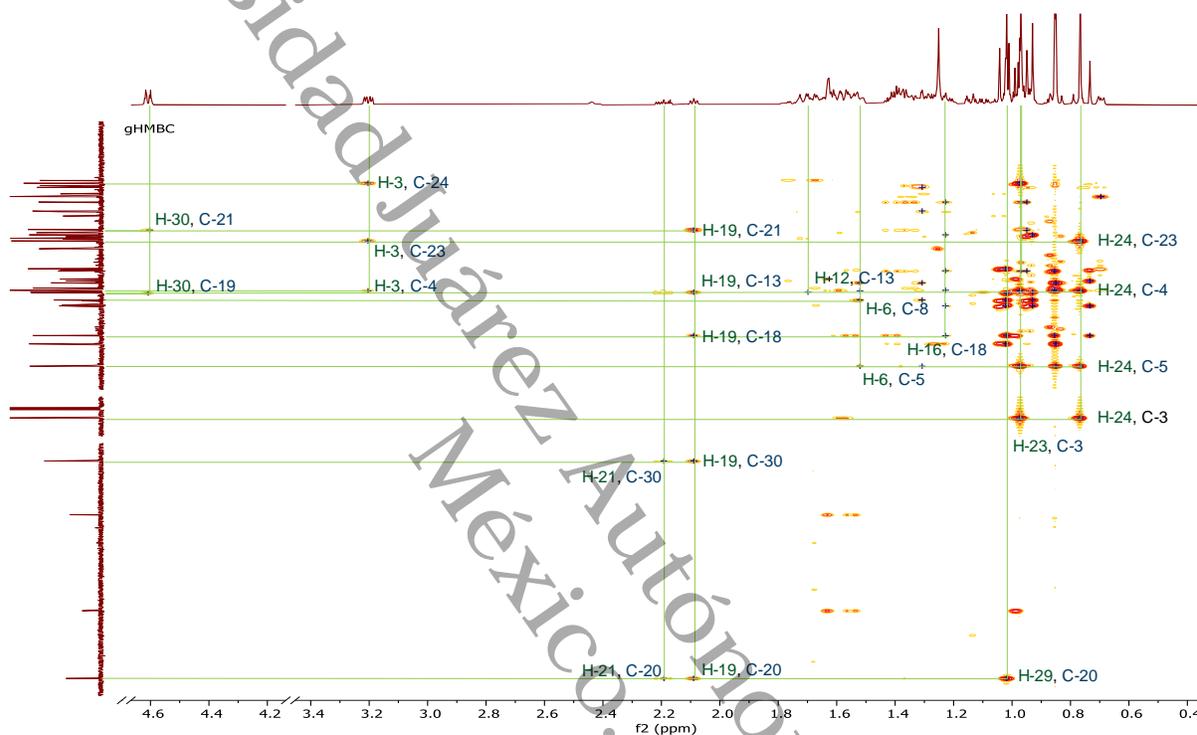


Figura 25. Experimento HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) (600 MHz) en CDCl_3 , t.a., del compuesto **2**.

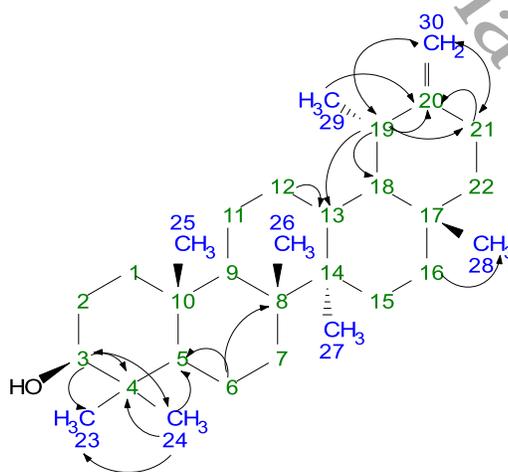


Figura 26. Principales correlaciones de HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) del compuesto **2**.

En la Tabla 5 se presenta un resumen de la elucidación de las señales de resonancia magnética nuclear del compuesto **2**.

Tabla 5. Datos espectroscópicos RMN-¹H (600 MHz) y RMN-¹³C (150 MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto **2**.

Posición	δ^1_{H} (δ , J en Hz)	δ^1_{H} (ppm)	δ^{13}_{C} (ppm)	δ^{13}_{C} (ppm)
	Experimental	Referencia*	Experimental	Referencia*
1	0.94, 1.71	0.95a (t), 1.73b (d)	36.25	38.77
2	1.58, 1.63	1.59a (q), 1.63b (d)	27.34	27.35
3	3.20 dd	3.20 dd	78.96	79.01
4	-	-	38.81	38.82
5	0.70	0.70 d	55.30	55.37
6	1.38, 1.52	1.38 (q), 1.53 (d)	18.23	18.29
7	1.39	1.35 m, 1.39 m	34.00	34.06
8	-	-	40.84	40.86
9	1.30	1.33 d	50.43	50.48
10	-	-	37.07	37.12
11	1.25 s, 1.54 m	1.28 q, 1.54 d	21.39	21.43
12	1.10m, 1.69 m	1.10 q, 1.69 d	26.12	26.17
13	1.59 t	1.60 t	39.11	39.17
14	-	-	42.10	42.02
15	0.94 m, 1.67 m	0.96 d, 1.68 t	26.60	26.64
16	1.15 m, 1.23 m	1.16 t, 1.25 d	38.24	38.31
17	-	-	34.47	34.53
18	0.97 t	0.97 t	48.60	48.67
19	2.09 m	2.11 m	39.31	39.40
20	-	-	154.58	154.57
21	2.19 m, 2.44m	2.20 m, 2.45 m	25.55	25.62
22	1.35 m, 1.41m	1.37 m, 1.41 m	38.70	38.88
23	0.97 s	0.97 s	27.92	28.02
24	0.77 s	0.76 s	15.31	15.39
25	0.85 s	0.85 s	16.23	16.78
26	1.02 s	1.02 s	15.83	15.87
27	0.93 s	0.94 s	14.7	14.76
28	0.85 s	0.85 s	19.42	19.49
29	1.02 d	1.02 d	25.46	25.54
30	4.61 m	4.62 m	107.08	107.15

*Reynolds *et al.*, (1986).

El compuesto **3** (28 mg) se obtuvo como un sólido blanco a partir de la fracción ZoaC2F3. El análisis de RMN-¹H de **3** (Figura 26) se presentaba de manera muy similar al obtenido para el compuesto **1**, por lo que se consideró nuevamente la presencia de un diterpeno de estructura kaurenoide, identificando señales a frecuencia alta: $\delta=5.24$ (1H, s, H-17) y $\delta=5.42$ (1H, t, $J=3.2$, H-11) que corresponden a protón de doble enlace. Por otra parte, se identificó una variación con respecto a los resultados obtenidos para el compuesto **1**, en donde se mostró una señal a frecuencia alta $\delta=5.60$ (1H, s, H-15), correspondiente a un protón de carbono unido a un éster, por lo que fue importante identificar en la estructura la presencia de un derivado. En ese sentido, se identificó un sistema AB, presentando dos señales a frecuencias altas: $\delta=7.70$ (1H, d, $J=16.14$, H-7') y $\delta=6.48$ (1H, d, $J=15.96$, H-8'), además, se identificaron señales en $\delta=7.53$ (1H, m, H-2' y H-6') y $\delta=7.37$ (1H, m, H-3', H-4' y H-5') que corresponden a protones de un sistema aromático. Estos resultados indican la presencia de un derivado *E*-cinámico acoplado al del esqueleto de kaureno.

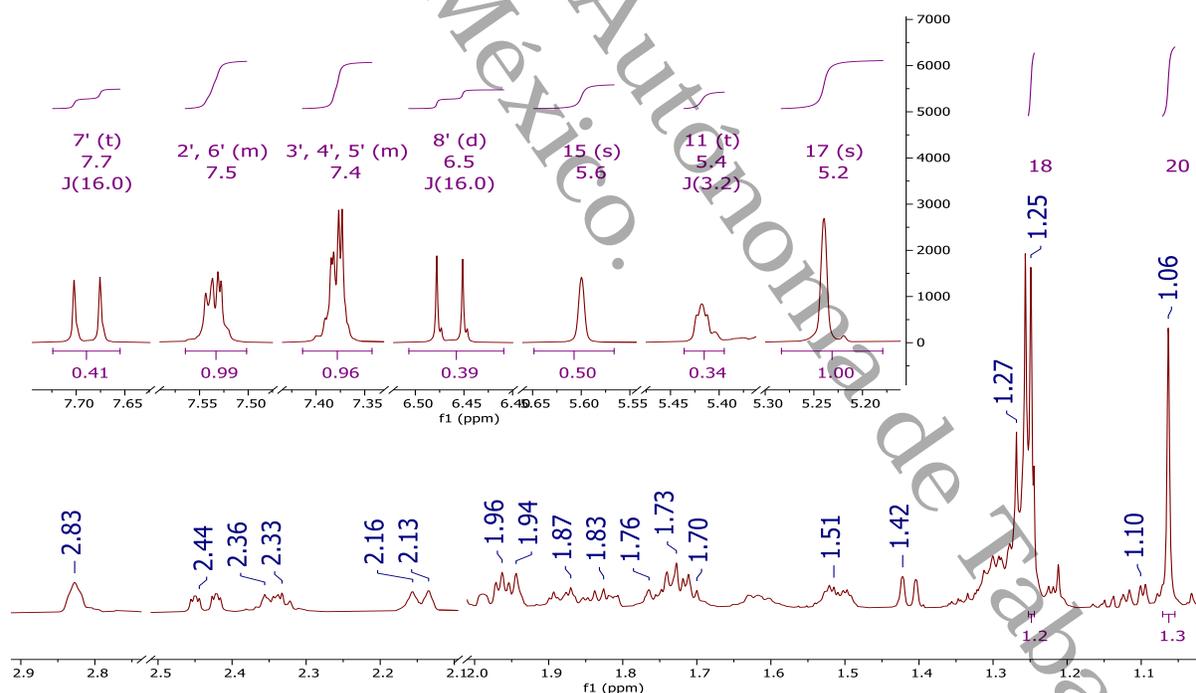


Figura 27. Espectro de RMN-¹H (600 MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto **3**.

En el experimento de RMN-¹³C (Figura 27), se identificaron los carbonos pertenecientes al derivado *E*-cinámico a frecuencias altas $\delta=134.5$ (C-1'), $\delta=128.0$ ppm (C-2', 6'), $\delta=130.2$ ppm (C-4') y $\delta=138.8$ ppm (C-3', 5'), señales que confirman la presencia de un sistema aromático, también se observaron señales en $\delta=144.6$ ppm (C-7') y $\delta=118.5$ ppm (C-8'), correspondientes al sistema AB, al igual que la señal en $\delta=166.3$ ppm, correspondiente al carbonilo (C-9'), además, se identificaron señales características del esqueleto de kaureno en $\delta=153.7$ (C-9), $\delta=118.3$ (C-11) y $\delta=158.3$ (C-16), 112.4 (C-17); pertenecientes a carbonos de doble enlace, también, se localizó la señal del carbonilo ubicado en $\delta=183.1$ ppm (C-19) y se identificó una señal en $\delta=79.4$ ppm (C-15) correspondiente al carbono unido al éster *E*-cinámico (Figura 28).

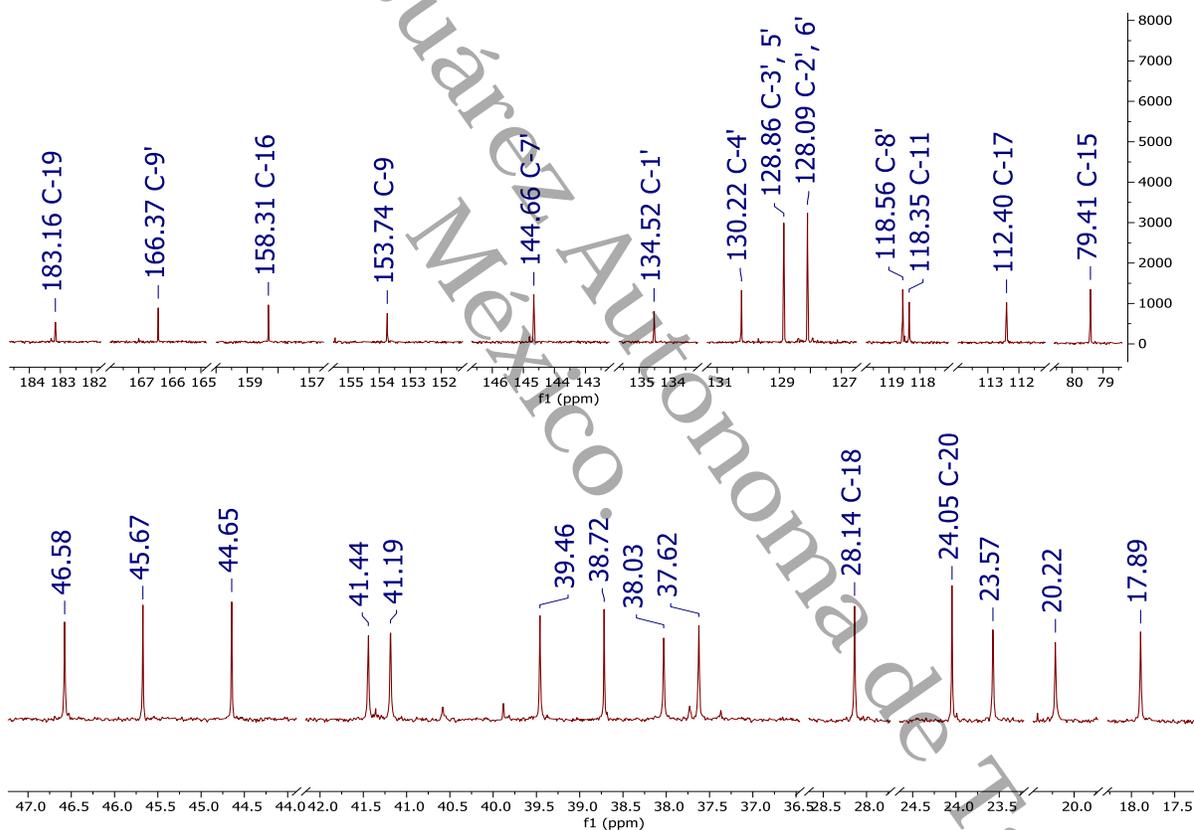


Figura 28. Espectro de RMN-¹³C (150 MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto **3**.

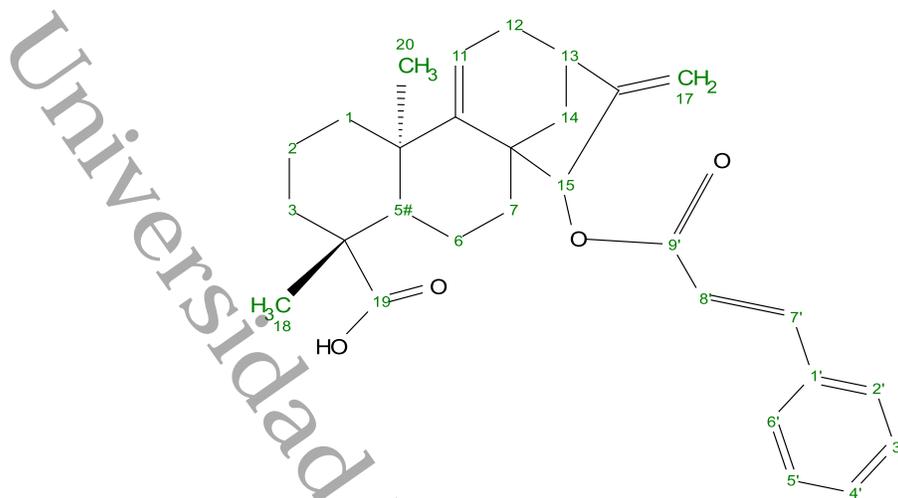


Figura 29. Estructura de un derivado *E*-cinámico en C-15 del esqueleto de kaureno.

En cuanto a los experimentos bidimensionales, permitió establecer las correlaciones entre protones y carbonos de la molécula. El análisis de espectroscopía de correlaciones (COSY) en el área del esqueleto de kaureno, mostró acoplamiento entre los protones 13 y 14a, asimismo, de los protones 11 y 12a, por otra parte, se muestran correlaciones en el área del derivado cinámico, entre los protones 7' y 8', además, de los protones 6' y 5' (Figura 29).

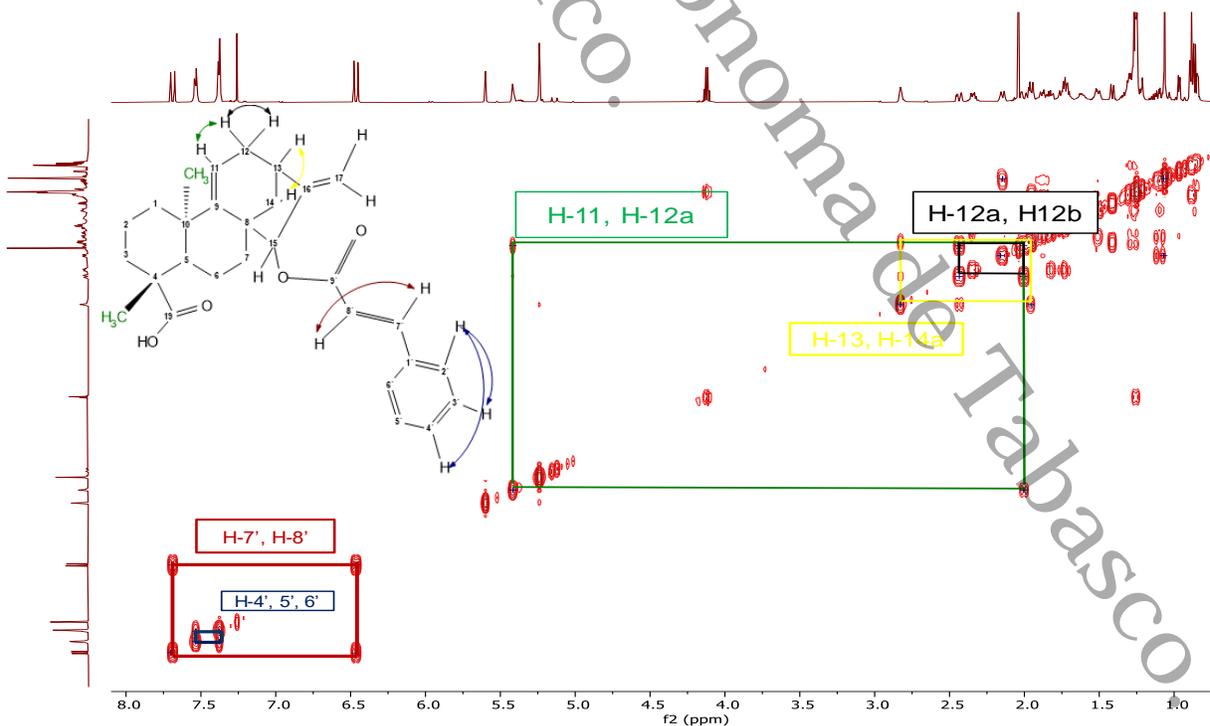


Figura 30. Experimento COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) (600 MHz) en CDCl_3 , t.a., del compuesto **3**.

También en el análisis de correlación heteronuclear de un único cuanto (HSQC) (Figura 30), se observó la correcta correlación entre las señales de carbonos y protones asignados en las posiciones $\delta=118.3-5.4$ (CH-11), $\delta=79.4-5.6$ (CH-15), $\delta=112.4-5.2$ (CH₂-17), $\delta=128.1, 7.5$ (CH-2',6'), $\delta=128.9-7.4$ (CH-3',5'), $\delta=130.2-7.4$ (CH-4'), $\delta=144.7-7.7$ (CH-7') y $\delta=118.6-6.5$ (CH-8') que concuerdan con los carbonos unidos al menos a un hidrógeno del esqueleto de kaureno y del derivado *E*-cinámico.

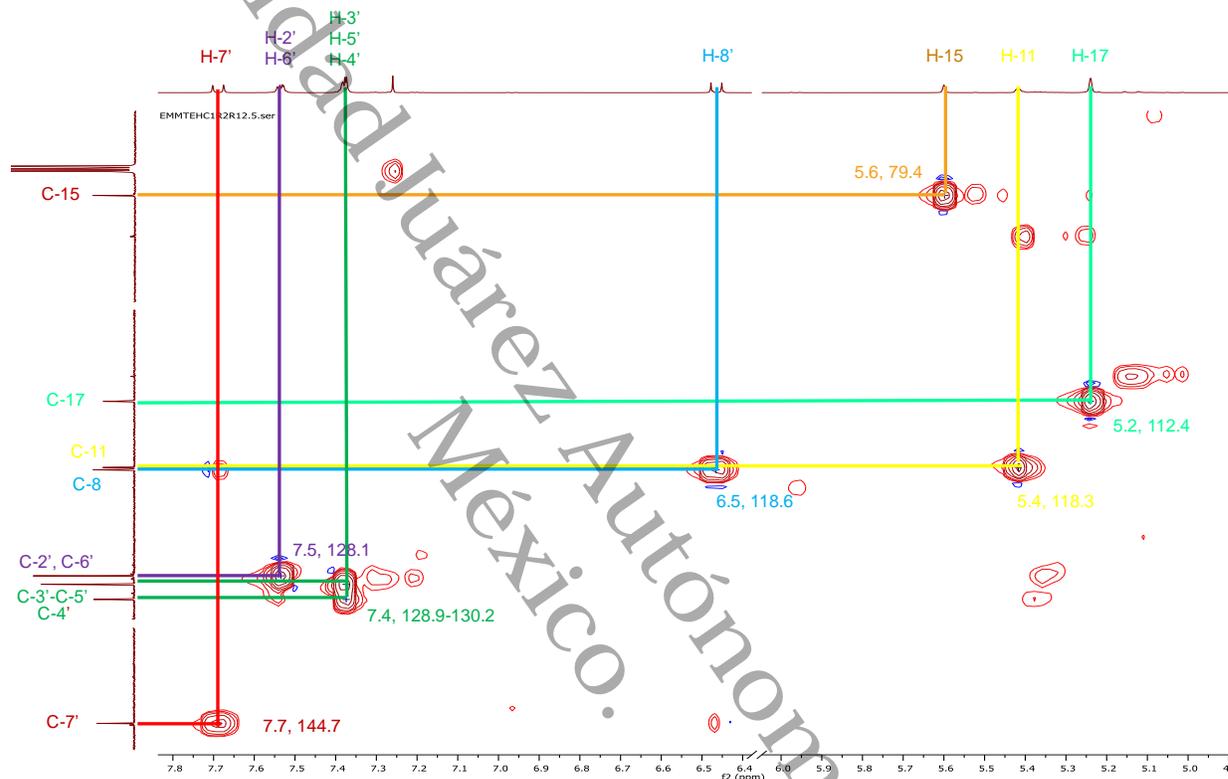


Figura 31. Experimento HSQC (¹H - ¹³C) (600MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto **3**.

Además, en el experimento de correlación heteronuclear a múltiples enlaces (HMBC), la relación a dos o tres enlaces se observó para H-12 con C-9, H-17 con C-13, C-15 y C-16, para H-14 con C-15 y 16, para H-18 con C-19. Asimismo, se muestran las correlaciones en el área del derivado cinámico de H-8' con C-9' y C-1', H-7 con C-1', C-7' y C-9', H-3' con C-1' y C-5' (Figura 31). Por otra parte, se muestra un acoplamiento entre H-15 y C-9', confirmando la unión del derivado cinámico en la posición C-15 del esqueleto del ácido grandiflorénico (Figura 32).

Existe el reporte de un derivado de Kaureno por Bohlmann (1978), en el cual indican la identificación del compuesto **3**, obtenido de *Montanoa pteropoda*. Sin embargo, solo presentan algunos datos de RMN -¹H (Tabla 6).

Tabla 6. Principales datos de RMN-¹H reportados por Bohlmann (1978).

Posición	RMN- ¹ H (270 MHz) CDCl ₃
H-11	t (<i>br</i>) 5.42
H-13	s (<i>br</i>) 2.84
H-15	s (<i>br</i>) 5.60
H-17	s (<i>br</i>) 5.25
H-18	s 0.98
H-20	s 1.20
OCOR	d 6.47
	d 7.70
	m 7.54
	m 7.40

Por otra parte, existe un reporte de un compuesto análogo denominado ácido *ent*-15 β-*E*-cinamoil-16-kauren-19-oico, el cual fue reportado por Suárez, A., *et al.*, (2013), aislado a partir de la corteza de *Croton gossypifolius*, encontrándose una diferencia en el carbono 9 y 11 con respecto al compuesto aislado; ¹³C experimental 153.7 (C-9) y 118.3 (C-11), referencia 52.9 (C-9) 19.1 (C-11), lo cual indica la presencia de un doble enlace, marcando una diferencia representativa entre las dos estructuras (Tabla 7). En ese sentido, este *ent*-kaureno se reporta por primera vez como metabolito secundario en *Montanoa tomentosa*.

En la tabla 7 se presenta un resumen de la elucidación de las señales de resonancia magnética nuclear del compuesto **3**.

Tabla 7. Datos espectroscópicos RMN-¹H (600 MHz) y RMN-¹³C (150 MHz) en CDCl₃, t.a., del compuesto **3**

Posición	δ^1_{H} (δ , J en Hz) Experimental	δ^1_{H} (ppm) Referencia*	δ^{13}_{C} (ppm) Experimental	δ^{13}_{C} (ppm) Referencia*
1a	1.27 (1H, m)	0.82	41.1	40.6
1b	1.96 (1H, m)	1.86		
2a	1.51 (1H, m)	1.61	20.2	28.5
2b	1.88 (1H, m)	1.82		
3	1.10 (1H, s)	2.02	38.0	37.7
	2.15 (1H, s)	2.15		
4	-	-	44.6	43.7
5	1.84 (1H, d)	1.06	46.5	56.7
6	1.73 (1H, m)	1.88	17.8	20.8
	2.35 (1H, m)			
7	1.75 (1H, m)	1.28	23.5	34.9
		1.77		
8	-	-	45.6	47.8
9	-	1.24	153.7	52.9
10	-	-	38.7	39.9
11	5.43 (1H, dd, 3.2 Hz)	1.52	118.3	19.1
		1.89		
12a	1.9 (1H, s)	1.53	37.6	32.7
12b	2.4 (1H, s)	1.70		
13	2.84 (1H, m)	2.86	39.4	42.6
14a	1.97 (1H, dd)	2.12	41.4	37.7
14b	1.42 (1H, dd)			
15	5.61 (1H, s)	5.39	79.4	83.1
16	-	-	158.3	155.5
17	5.25 (2H, s)	5.09	112.40	110.3
		5.11		
18	1.25 (3H, s)	1.20	28.1	28.9
19	-	-	183.1	184.4
20	1.07 (3H, s)	0.95	24.5	15.1
1'	-	-	134.5	134.5
2'	7.54 (1H, d, 2.02)	7.52	128.0	128.9
3'	7.37 (1H, d, 2.20)	7.37	128.8	128.2
4'	7.37 (1H, d, 2.20)	7.37	130.2	130.4

5'	7.37 (1H, d, 2.20)	7.37	128.8	128.2
6'	7.54 (1H, d, 2.02)	7.52	128.0	128.9
7'	7.7 (1H, d, 16.14)	7.64	144.6	144.9
8'	6.47 (1H, d, 15.96)	6.48	118.5	118.5
9'	-	-	166.3	167.1

*Suárez, *et al.*, (2013).

Con la finalidad de confirmar la presencia del compuesto **3** en la fracción ZoaC2F3, se realizó un análisis de espectrometría de masas (Figura 33) mediante un espectrómetro de masas de triple cuádruplo TQD (Water, Milford, MA, USA) acoplado a un cromatógrafo líquido Acquity a través de una fuente de iones combinada de electrospray-APCI Z-spray. Los resultados indican la presencia en el ion positivo EI-MS, el ion cuasimolecular, alcanzando su punto máximo a m/z 469.32 $[M + Na]^+$ (calculado para $C_{29}H_{34}O_4$, 446.59 g/mol). Además, se muestra el ion cuasimolecular, alcanzando su punto máximo a m/z 299.29 $[M - H]^+$ (calculado para $C_{20}H_{28}O_2$, 300.44 g/mol).

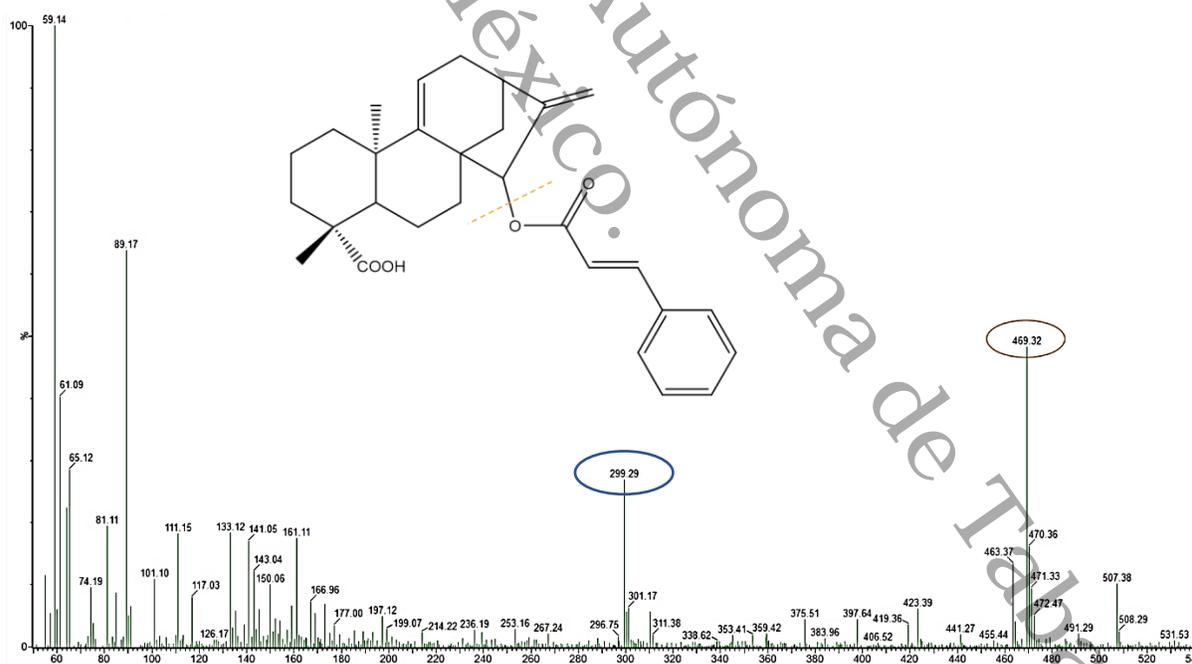
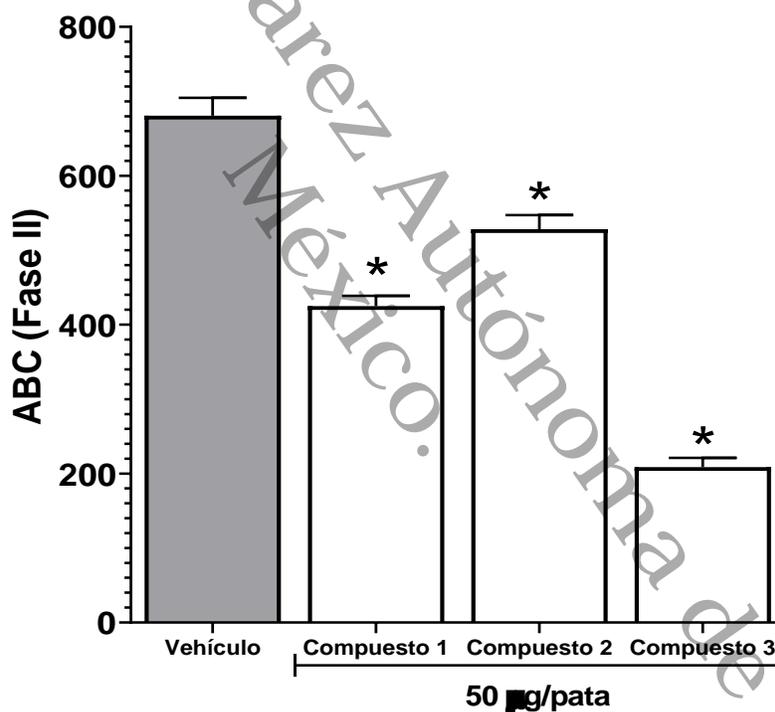


Figura 34. Espectrometría de masas del compuesto **3**, mostrando la presencia del compuesto **3** (pico 469.32 $[M + Na]^+$), además, se muestra la presencia del esqueleto del ácido ent-kaura-9 (11), 16-dien-18-oico (pico 299.29 $[M - H]^+$).

8.7. Evaluación preliminar de la actividad antinociceptiva de compuestos obtenidos a partir del extracto hexánico de *Montanoa tomentosa*

Los compuestos 1, 2 y 3 fueron evaluados en su actividad antinociceptiva en el modelo de formalina. En ese sentido, la aplicación de la formalina aumentó la nocicepción en la fase uno, la cual se vio reflejada con el aumento en el retiro espontáneo de la pata de la rata, con respecto a la fase dos. Sin embargo, los compuestos evaluados solo disminuyeron la actividad nociceptiva durante la segunda fase, mostrando una protección contra el dolor inflamatorio. Asimismo, como se puede observar en la gráfica 3, los compuestos 1, 2 y 3 mostraron una disminución de la nocicepción a una dosis de 50 µg/pata con respecto al grupo que solo recibió el vehículo.



Gráfica 3. Efecto de la administración de los compuestos 1, 2 y 3 a una dosis de 50 µg/pata sobre el comportamiento nociceptivo inducido por formalina durante la fase II. Cada barra representa el promedio ± el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ significativamente diferente en comparación con el vehículo. Análisis de una vía ANOVA, seguida de un estudio de Tukey.

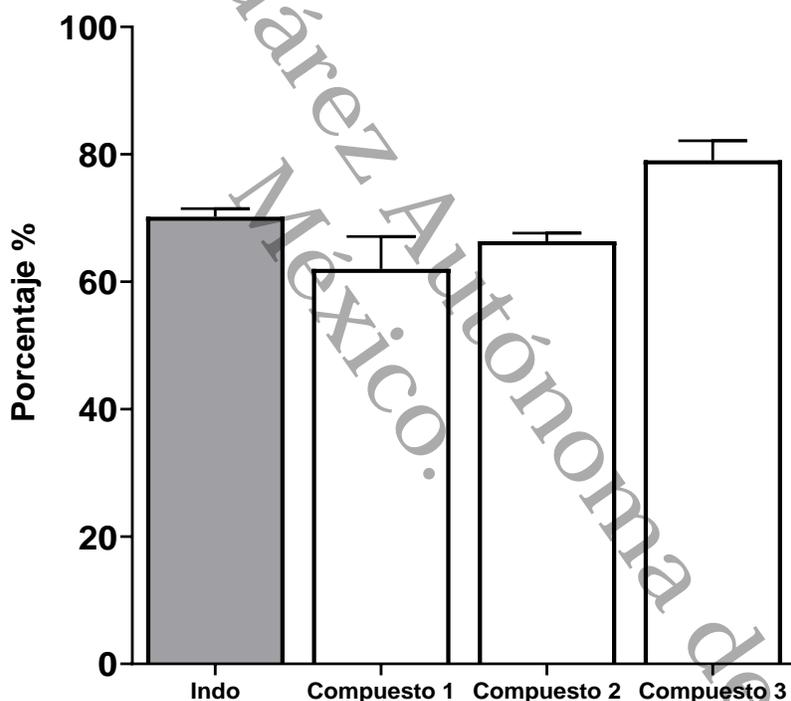
No obstante, cuando se comparan los tres compuestos, se puede observar que el compuesto **3** presenta una mayor potencia antinociceptiva, con respecto a los compuestos **1** y **2** evaluados a la misma dosis. Esto significa que se requiere una dosis menor para que el compuesto **3** genere un efecto similar al mostrado por los compuestos **1** y **2**. Evidentemente hace falta seguir explorando su actividad farmacológica, no sólo en el modelo de formalina, si no, empleando otros modelos que permitan obtener más información acerca de su actividad, además de emplear fármacos disponibles que permitan comparar y sugerir los mecanismos posibles que lleven al efecto antinociceptivo. Conjuntamente, sería interesante determinar sus efectos adversos y su toxicidad a corto plazo. Además, estos resultados sugieren que los compuestos **1** y **3** son nuevas entidades químicas con potencial aplicación terapéutica en el tratamiento del dolor inflamatorio. Por otra parte, en extractos poco polares de diferentes plantas del género *Montanoa*, se ha reportado la presencia de compuestos del tipo terpeno, principalmente diterpenos como el ácido kaureonico, el cual ha presentado actividad antinociceptiva en el dolor inducido térmicamente (prueba de movimiento de la cola), así como en dolor inducido por sustancias químicas, e.g. la administración intraplantar de capsaicina (Dalenogare *et al.*, 2019), los autores sugieren que el mecanismo de acción del ácido kaureonico se lleva a cabo mediante la inhibición de las citocinas proinflamatorias y la activación de la vía de señalización de los canales NO-cíclicos GMP-ATP-K⁺ (Block *et al.*, 1998. Mizokami *et al.*, 2012). De igual manera, se demostró que compuestos del tipo kaureno como la kamebanina, kamebacetal A, kamebakaurina y excisania A, aislados de *Isodon japonicus*, presentaban un potente efecto antinociceptivo. Los autores sugieren que el mecanismo de acción se debe a la inhibición en la producción de NO y PGE₂ al inhibir la activación de NF-κB inducida por LPS. Además, los autores sugieren que estructuralmente, el metileno exocíclico que presentan algunos diterpenos del tipo kaureno podría ser el posible grupo funcional responsable de la inhibición de la activación de NF-κB. Sin embargo, otros factores como la lipofilia y la geometría molecular de los diterpenos naturales serían factores importantes en la inhibición de la activación de NF-κB (Nam., 2006. Sun *et al.*, 2002). Aún quedan estudios por dilucidar cómo participan los diterpenos de kaureno en los pasos de la inhibición en la activación de NF-κB. Por otra parte, el taraxasterol (**2**) y diversos triterpenos son compuestos

ampliamente distribuidos en las plantas y su actividad antinociceptiva ya ha sido descrita en estudios anteriores. Por ejemplo, un estudio realizado por Nobre da Silva en 2017, demostró que compuestos del tipo triterpeno como β -amirina, taraxasterol y pseudo-taraxasterol, obtenidos de las partes aéreas de *Pluchea quitoc* DC. (*Asteraceae*), presentaron un efecto antinociceptivo, esto en el modelo de retorcimiento y movimiento de la cola inducidos por ácido acético. Asimismo, se aislaron dos compuestos derivados del taraxasterol; miristato de taraxasterol y acetato de taraxasterol a partir de una fracción de *n*-hexano del extracto metanólico de la raíz de *Scorzonera latifolia*. Estos compuestos mostraron una potente actividad antinociceptiva tanto en el modelo de retorcimiento como en el modelo de movimiento de cola inducidos por ácido acético (Bhadir *et al.*, 2010).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

8.8. Evaluación preliminar del efecto antiinflamatorio de los compuestos obtenidos a partir del extracto hexánico de *Montanoa tomentosa*

Los compuestos 1, 2 y 3 obtenidos a partir del extracto hexánico de *Montanoa tomentosa* fueron evaluados en su actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA a una dosis de 1 mg/oreja. En ese sentido, los compuestos 1 y 2 disminuyeron el edema inducido por la aplicación tópica del TPA en un 62.02 ± 5.08 % y 66.37 ± 1.27 %, respectivamente, mostrando un resultado similar al grupo que recibió indometacina (70.20 ± 1.26 %) como control positivo. Sin embargo, el compuesto 3, presentó una mayor inhibición del edema en un 79.05 ± 3.07 %, en comparación con el grupo de indometacina (Gráfica 4).



Gráfica 4. Efecto de la administración de los compuestos 1, 2 y 3 a una dosis de 1 mg/oreja, sobre la disminución de edema inducido por TPA. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 6 animales. No se encontraron diferencias significativas (* $p < 0.05$) entre los compuestos y el fármaco de referencia. Análisis de una vía ANOVA, seguida de un estudio de Tukey.

Estos resultados comprueban que en las hojas de *Montanoa tomentosa*, existen compuestos con actividad antiinflamatoria. Asimismo, no existen estudios que comprueben la actividad antiinflamatoria del ácido grandiflorénico (**1**). Por lo tanto, este estudio aporta información con respecto a sus posibles aplicaciones terapéuticas. Por otra parte, el taraxasterol (**2**), mostro un efecto antiinflamatorio similar al obtenido por indometacina. Asimismo, de acuerdo con diversos autores, el taraxasterol tiene considerables actividades antiinflamatorias en modelos *in vivo*; por ejemplo, se probó la actividad antiedematosa en el modelo de carragenina, mostrando la inhibición del edema de la pata de la rata de manera marcada durante cada fase del desarrollo. Además, se probó su actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por dimetilbenceno, los autores sugieren que el efecto inhibidor del edema de la oreja del taraxasterol se debe a que atenúa la vasodilatación y la extravasación plasmática de inflamación neurogénica (Wang *et al.*, 2016) , Asimismo, para poder elucidar la vía mediante la cual el taraxasterol lleva a cabo su actividad antiinflamatoria, se realizaron evaluaciones en diferentes modelos *in vitro*; por ejemplo, se investigó la actividad antiinflamatoria en macrófagos murinos RAW 264.7 inducidos por LPS, demostrando su actividad mediante el bloqueo de la vía de NF- κ B, además de inhibir la producción de NO y de citocinas proinflamatorias como PGE₂, TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Zhang *et al.*, 2012). También, mostró inhibición de la expresión de óxido nítrico sintasa (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) evitando la producción de mediadores inflamatorios (Xiong *et al.*, 2014). Estos estudios han demostrado su potencial actividad antiinflamatoria, siendo considerado como una fuente potencial de medicamentos antiinflamatorios de origen natural.

Por otra parte, al comparar la relación estructura-actividad de los compuestos **1** y **3**, se sugiere que el compuesto **3** muestra una mayor potencia antinociceptiva y antiinflamatoria en comparación con el compuesto **1** debido a la presencia del derivado cinámico en C-15, lo que permite un aumento en su actividad. Asimismo, de acuerdo con la bibliografía, se ha reportado que el ácido cinámico actúa como un agente antiinflamatorio sobre la vía de la lipooxigenasa, inhibiendo el metabolismo del ácido araquidónico, la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, proponiéndose como un posible mecanismo de acción antiinflamatoria de los fenilpropanoides (Hadjipavlou-

Litina *et al.*, 2015. de Cássia *et al.*, 2014. Godoy *et al.*, 2000). Además, se ha reportado que un dímero de ácido ferúlico (un derivado del ácido cinámico) mostró una supresión del dolor agudo inducido por formalina, dicho efecto se observó principalmente en la fase inflamatoria y no se observaron cambios de comportamiento aparente relacionado con el sistema nervioso. Los autores sugieren que el efecto antinociceptivo no opioide se lleva a cabo mediante la unión del receptor de adenosina A₃ (Priebe *et al.*, 2018). Es interesante destacar que son escasos los estudios que demuestre la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria del ácido grandiflorénico (**1**), por lo tanto, estos resultados aportan nueva información con respecto a posibles aplicaciones terapéuticas a las ya descritas anteriormente, como: agente uterotónico, uterorelajante, bloqueador de canales de Ca⁺ y antibiótico (Lozoya, *et al.*, 1983. Bejar *et al.*, 1984. Campos-Bedolla *et al.*, 1997. Ghisalberti *et al.*, 1997). Por otra parte, se realizó el aislamiento de un compuesto nuevo a partir de las hojas de *Montanoa tomentosa*, el cual se ha denominado como ácido *ent*-15 β -*E*-cinamoil-kaura-9(11),16-dien-19-oico (**3**). Además de demostrar por primera vez su efecto antinociceptivo y antiinflamatorio.

8. Conclusiones

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo a partir de la evaluación antinociceptiva y antiinflamatoria de los extractos y compuestos obtenidos de la hoja de *Montanoa tomentosa*, se concluye lo siguiente:

- El extracto hexánico de la hoja de *Montanoa tomentosa* disminuyó la nocicepción inducida por formalina en la fase II del modelo en un 66.3 ± 3.0 %, presentando un resultado similar al meloxicam (64.3 ± 4.5 %), mostrando su actividad antinociceptiva.
- El extracto hexánico de la hoja de *Montanoa tomentosa* presentó mayor disminución del edema inducido por TPA en oreja de ratón (61.16 ± 3.8 %), similar al presentado por indometacina (70.02 ± 1.24 %), demostrando su actividad antiinflamatoria.
- Se aislaron y caracterizaron tres compuestos del tipo terpeno, dos de ellos conocidos: ácido grandiflorénico (**1**) y taraxasterol (**2**), además, se describe por primera vez, un nuevo derivado kaurenoide (**3**) en *Montanoa tomentosa*, denominado ácido *ent*-15 β -*E*-cinamoil-kaura-9(11),16-dien-19-oico.
- Los compuestos **1**, **2** y **3**, presentaron eficacia en la disminución de la nocicepción e inflamación, en los modelos de formalina y edema inducido por TPA, siendo el compuesto **3** el que presentó un mayor efecto.

Los resultados encontrados en el presente trabajo indican que el extracto hexánico y sus compuestos obtenidos de la hoja de *Montanoa tomentosa*, tiene potencial para utilizarse en el desarrollo de un fitomedicamento útil como una alternativa terapéutica en el tratamiento del dolor y la inflamación.

9. Perspectivas

El estudio sistemático de los compuestos obtenidos a partir del extracto hexánico de las hojas de *Montanoa tomentosa* debe continuar, implementando diferentes modelos *in vivo* como el edema inducido por carragenina en ratas Wistar que aporten información sobre su eficacia como un potente antiinflamatorio y antinociceptivo. Además, se deben emplear modelos *in vitro* como la determinación de TNF α y especies reactivas de oxígeno, esto para poder identificar su posible modo de acción. Por otra parte, también es importante poder determinar su toxicidad aguda y crónica, así como sus posibles efectos secundarios, esto para poder proponer, a partir de estos compuestos, el desarrollo de un fitomedicamento, que sea eficaz y efectivo como un potencial agente antinociceptivo y antiinflamatorio. Igualmente, realizar la cuantificación de la concentración de los componentes principales de las hojas de *Montanoa tomentosa* mediante GC-MS.

México. Autónoma de Tabasco.

10. Referencias

- Amado, N.G., Cerqueira, D.M., Menezes, F.S. (2009). "Isoquercitrin isolated from *Hyptis fasciculata* reduces glioblastome cell proliferation and changes beta - catenin cellular localization". *Anticancer Drugs*, 20, 543-552.
- Aragao, G. F., Pinheiro, M. C. C., Bandeira, P. N., Lemos, T. L. G., Viana, G. S. d. B. (2008). "Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha-and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) march". *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 7(2), 31-47.
- Ascari, J., de Oliveira, M.S., Nunes, D.S., Granato, D., Scharf, D.R., Simionatto, E., Otuki, M., Soley, B., Heiden, G. (2019) "Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of the essential oils from male and female specimens of *Baccharis punctulata* (Asteraceae)". *Journal of Ethnopharmacology*, 24, 1-7.
- Bahadır, Ö., Çitoğlu, G. S., Šmejkal, K., Dall'Acqua, S., Özbek, H., Cvacka, J., Zemlicka, M. (2010). "Analgesic compounds from *Scorzonera latifolia* (Fisch. and Mey.) DC". *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 83-87.
- Bejar E. (1988). "Preliminary investigation of the estrogenic potential of grandiflorenic acid from *Montanoa tomentosa*". *Journal of ethnopharmacology*, 23(2-3), 329–331.
- Bejar, E., Enriquez, R., Lozoya, X. (1984). "The in vitro effect of grandiflorenic acid and zoapatle aqueous crude extract upon spontaneous contractility of the rat uterus during oestrus cycle". *Journal of Ethnopharmacology*, 11(1), 87-97.
- Béjar, E., Reyes-Chilpa, R., Jiménez-Estrada, M. (2000). "Bioactive compounds from selected plants used in the XVI century Mexican traditional medicine". In: Atta Ur-Rahman (ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Scientific Publishers.1. Ed. Amsterdam. 24, 799-843.
- Block, L.C.; Santos, A.R.S., de Souza, M.M., Scheidt, C., Yunes, R.A., Santos, M.A., Monache, F.D., Filho, V.C. (1998). "Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*". *Journal of Ethnopharmacology*. 61, 85-89.
- Bohlmann, F., Le Van, N. (1978). "Neue kaurensäure-derivate und germacranolide aus *Montanoa pteropoda*". *Phytochemistry*. 17(11), 1957-1960.

- Caballero, Y., Walls, F. (1970). "Productos naturales del zoapatle (*Montanoa tomentosa* Cerv.)". Boletín del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. 22, 79-102.
- Cafarchia, C., De Laurentis, N., Milillo, M.A., Losacco, V., Puccini, V. (2001). "Fungistatic activity of a sesquiterpene lactone (tomentosin) isolated from fresh *Inula viscosa* (Asteraceae) flowers from the Puglia region". Parasitología. 43, 117.
- Campos-Bedolla, P., Campos, M. G., Valencia-Sánchez, A., Ponce-Monter, H., Uribe, C., Osuna, L., Calderón, J. (1997). "Effect of kauranes from *Montanoa spp.* on rat uterus". Phytotherapy Research. 11(1), 11-16.
- Carro-Juárez, M., Lobatón, I., Benítez, O., Espíritu, A. (2006). "Pro-ejaculatory effect of the aqueous crude extract of cihuapatli (*Montanoa tomentosa*) in spinal male rats". Journal of Ethnopharmacology. 106(1), 111-116.
- Dalenogare, D.P., Ferro, P.R., De Pra, S.D.T., Rigo, F.K., de David Antoniazzi, C.T., de Almeida, A.S., Damiani, A.P., Strapazzon, G., de Oliveira Sardinha, T.T., Galvani, N.C. (2019). "Antinociceptive activity of *Copaifera ocinalis* Jacq. L oil and kaurenoic acid in mice". Inflammopharmacology. 2019, 27, 829-844.
- de Cássia da Silveira e Sá, R., Andrade, L. N., dos Reis Barreto de Oliveira, R., de Sousa, D. P. (2014). "A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils". Molecules. 19(2), 1459-1480.
- Dewick, P. M. (2009). Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, 3rd Edition
- Dubuisson, D., Dennis, S.G. (1997). "The formaline test: a quantitative study of the analgesic effect of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats". Pain. 4, 161-174.
- Enríquez, R.G., Miranda, G.E., Ortiz, B., León, I., Magos, G., Peña, A., Reynolds, W., Gnecco, D. (1996). "The unambiguous detection of kaurenic derivatives in aqueous infusions of *Montanoa tomentosa* by GC - MS and 2D - NMR spectroscopy: an answer to contradictory reports". Planta Medica. 62, 569-571.
- Enríquez, R.G., Barajas, J., Ortiz, B., Lough, A.J., Reynolds, W.F., Yu, M., (1997) Comparison of crystal and solution structures and ¹H and ¹³C chemical shifts for

grandiflorenic acid, kaurenoic acid and monoginoic acid. Canadian Journal of Chemistry. 75, 342-7

- Feldman M., & McMahon A.T. (2000). "Do Cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity?". Annals of Internal Medicine. 132, 134-143
- Funk, V.A. & Brooks, D.R. (1990). "Phylogenetic systematics as the basis of comparative biology": Smithsonian Contributions to Botany. 73, 1-45.
- Gallegos A.J. (1983) "The zoapatle I. A traditional remedy from Mexico emerges to modern times". Contraception. 27, 211-225.
- Geissman, T.A., Griffin, T.S. (1971) "Sesquiterpene lactones. Tomentosin from *Montanoa tomentosa* Cerv". Revista Latinoamericana de Química. 2, 81-83.
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S. (2008). "Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid". Proceedings of the National Academy of Sciences. 105, 9099-9104.
- Ghisalberti E.L. (1997) "The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes". Fitoterapia. 68(4), 303-325.
- Godoy, M. E., Rotelli, A., Pelzer, L., Tonn, C. E. (2000). "Antiinflammatory activity of cinnamic acid esters". Molecules. 5(3), 547-548.
- González-Darder J.M. (2000). "Animal pain models and ethical issues regarding animal experimentation". Revista de la Sociedad Española del dolor. 7, 313-318.
- Hadjipavlou-Litina, D., & Pontiki, E. (2015). "Aryl-acetic and cinnamic acids as lipoxygenase inhibitors with antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activity". Advanced Protocols in Oxidative Stress III. 361-377.
- Hahn, D.W., Tobia, A.J., Rosenthale, M.E., McGuire, J.L. (1984). "Antifertility activity and general pharmacological properties of ORF 13811: A synthetic analog of zoapatanol". Contraception. 30, 39-53.
- Hernández-Pérez, M., Sánchez-Mateo, C., Montalbetti-Moreno, Y., Rabanal, R. (2004). "Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part". Journal of Ethnopharmacology. 93, 279-284.
- Huang, J.L., Fu, S.T., Jiang, Y.Y., Cao, Y. B., Guo, M. L., Wang, Y., Xu, Zheng. (2007). "Protective effects of Nicotiflorin on reducing memory dysfunction, energy

metabolism failure and oxidative stress in multi-infarct dementia model rats". *Pharmacology Biochem Behavior*. 86, 741-748.

- Kast, R., Fürstenberger, G., Marks, F. (1993). "Phorbol ester TPA-and bradykinin induced arachidonic acid release from keratinocytes is catalyzed by a cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)". *Journal of Investigative Dermatology*. 101(4), 567-572.
- Kim, K. R., Jeong, C. K., Park, K. K., Choi, J. H., Park, J. H. Y., Lim, S. S., Chung, W. Y. (2010). "Anti-inflammatory effects of licorice and roasted licorice extracts on TPA induced acute inflammation and collagen-induced arthritis in mice". *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-8.
- Lagunes-Merino, O., Rodríguez-Landa, J. F., Caba, M., & cols. (2019). "Acute effect of an infusion of *Montanoa tomentosa* on despair-like behavior and activation of oxytocin hypothalamic cells in Wistar rats". *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 10(1), 45-51.
- Landgren, B. M., Aedo, A. R., Hagenfeldt, K., Ditiatusy, E. (1979). "Clinical effects of orally administered extract of *Montanoa tomentosa* in early human pregnancy". *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 135. 480-484
- Levine, S. D., Adams, R. E., Chen, R. H., Cotter, M. L., Hirsch, A. F., Kane, V. V., Kanojia, R. M., Shaw, C., Wachter, M. P. (1979). "Zoapatanol and montanol, novel oxepane diterpenoids from the Mexican plant zoapatle (*Montanoa tomentosa*)". *Journal of the American Chemical Society*. 101, 3404-3405.
- Levine, S.D, Hahn, D.W., Cotter, M. L., Greenslade, F. C., Kanojia, R. M., Pusquale, S. A., Wachter, M., McGuire, J. L. (1981). "The Mexican plant zoapatle (*Montanoa tomentosa*) in reproductive medicine". *The Journal of Reproductive Medicine*. 26, 524-528.
- Li, R., Guo, M., Zhang, G., Xu, X., Li, Q. (2006). "Neuroprotection of Nicotiflorin in Permanent Focal Cerebral Ischemia and in Neuronal Cultures". *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 29(9), 1868-1872.
- Lozoya, X., Enríquez, R. G., Bejar, E., Estrada, A. V., Girón, H., Ponce-Monter, H., Gallegos, A. J. (1983). "The zoapatle V - The effect of kauradienoic acid upon uterine contractility". *Contraception*. 27(3), 267-279.

- Lu, Z.Z., Xue, H.Z., Tu, Z.B., Konno, C., Waller, D. P., Soejarto, D. D., Cordell, G. A., Fong, H. H. (1987). "Studies on zoapatle, VII. Angeloylgrandifloric acid, a spontaneous uterine contraction inhibitor (SUCI) from *Montanoa tomentosa* ssp. *tomentosa*". Journal of Natural Products, 50, 995-997.
- Melo, C. M., Morais, T. C., Tomé, A. R., Brito, G. A. C., Chaves, M. H., Rao, V. S., Santos, F. A. (2011). "Anti-inflammatory effect of α - β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice". Inflammation Research. 60, 673 -681.
- Mi, Q., Lantvit, D., Reyes-Lim, E., Chai, H., Zhao, W., Lee, I. S., Peraza-Sánchez, S., Ngassapa, O., Kardono, L. B., Riswan, S., Hollingshead, M. G., Mayo, J. G., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M. (2002). "Evaluation of the potential cancer chemotherapeutic efficacy of natural product isolates employing in vivo hollow fiber tests". Journal of Natural Products. 65, 842-865.
- Mizokami, S.S., Arakawa, N.S., Ambrosio, S.R., Zarpelon, A.C., Casagrande, R., Cunha, T.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Verri, W.A., Jr. (2012). "Kaurenoic acid from *Sphagneticola trilobata* Inhibits Inflammatory Pain: Effect on cytokine production and activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway". Journal of Natural Products. 75, 896-904.
- Morales, P. E., Aparicio, M. A., Ramón-Frias, T., Pérez, A., Juárez, I. E. (2018). "Actividad anti-inflamatoria de la pomada de *Montanoa tomentosa* (zoapatle) en ratas Wistar". Panorama Actual de Salud en Tabasco. 2, 18-23.
- Nam, N.-H. (2006). Naturally Occurring NF- κ B Inhibitors. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 6(8), 945-951.
- Nobre da Silva, F. A., de Farias Freire, S. M., da Rocha Borges, M. O., Vidal Barros, F. E., de Sousa, M., de Sousa Ribeiro, M. N., Pinheiro Guilhon, G., Müller, A. H., Romão Borges, A. C. (2017). "Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Triterpenes from *Pluchea quitoc* DC. Aerial Parts". Pharmacognosy Research. 9(Suppl 1), S1-S4.
- NOM-062-ZOO-1999. (1999). "Guidelines (Technical Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals".

- Oshima, Y., Cordell, G.A., Fong, H.H.S. (1986a). "Oxepane diterpenes from *Montanoa tomentosa*". *Phytochemistry*. 25, 2567-2568.
- Oshima, Y., Cordell, G.A., Fong, H.H.S. (1986b). "Studies on zoapatle III. Flavonoid glycosides from *M. tomentosa ssp. tomentosa*". *Journal of Natural Products*. 49, 552-553.
- Otuki, M. F., Ferreira, J., Lima, F. V., Meyre-Silva, C., Malheiros, A., Muller, L. A., Calixto, J. B. (2005). "Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 313(1), 310-318.
- Pandith, H.; X. Zhang, S. Thongpraditchote, Y. Wongkrajang, W. Gritsanapan, y S. Joon-Baek, (2013). "Effect of Siam weed extract and its bioactive component scutellarein tetramethyl ether on anti-inflammatory activity through NF-κB pathway". *Journal of Ethnopharmacology*. 147, 434-441.
- Payá, M., Ferrándiz, M. L., Sanz, M. J., Bustos, G., Blasco, R., Ríos, J. L., Alcaráz, M. J. (1993). "Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean coast in mice". *Phytotherapy Research*. 7, 159-162.
- Pérez-García, F.; E. Marin, T. Parella, T. Adzet, y S. Canigueral, (2005). "Activity of taraxasteryl acetate on inflammation and heat shock protein synthesis". *Phytomedicine*. 12, 278-284.
- Ponce-Monter, H., Girón, H., Lozoya, X., Enríquez R. G., Bejar E, Estrada, A. V., Gallegos, A. J. (1983). "The zoapatle III. Biological and uterotonic properties of aqueous plant extract". *Contraception*. 27, 239-253.
- Priebe, A., Hunke, M., Tonello, R., Sonawane, Y., Berta, T., Natarajan, A., Bhuvanesh, N., Pattabiraman, M. Chandra, S. (2018). "Ferulic acid dimer as a non-opioid therapeutic for acute pain". *Journal of Pain Research*. 11, 1075-1085.
- Quijano, L., Calderón, J. S., Gómez, F., & Ríos, T. (1982) "Zoapatanolide A and B, two new heliangolides from *Montanoa tomentosa*". *Phytochemistry*. 21(8), 2041-2044.

- Quijano, L., S. Calderón, J., Federico, G. G., Virginia, R. M., & Ríos, T. (1985a). "Oxepane diterpenoids sesquiterpene lactones from "zoapatle" (*Montanoa tomentosa*), a mexican plant with oxytocic activity". *Phytochemistry*. 24(10), 2337-2340.
- Quijano, L., Calderón, J.S., Gómez-Garibay, F., Rosario, V., Ríos, T. (1985b). "Acyclic precursor of the uterotonic oxepane diterpenoids of "zoapatle" (*Montanoa tomentosa*)". *Phytochemistry*. 24, 2741-2743.
- Quijano, L., Gómez G, F., S. Calderón, J., López P, J., Rios, T. (1984). "Zoapatanolides C and D, two guaianolides from *Montanoa tomentosa*". *Phytochemistry*. 23(1), 125-127.
- Quijano, L., Gómez-G, F., Sierra-R, E., Rios, T. (1991). "Acyclic diterpenes and sesquiterpene lactones from *Montanoa tomentosa* ssp. *tomentosa*". *Phytochemistry*. 30(6), 1947-1950.
- Reynolds, W. F., Enríquez, R. G., Escobar, L. I., & Lozoya, X. (1984). "Total assignment of ^1H and ^{13}C spectra of kauradien-9(11),16-oic acid with the aid of heteronuclear correlated 2D spectra optimized for geminal and vicinal ^{13}C - ^1H coupling constants: or what to do when "INADEQUATE" is imposible". *Canadian Journal of Chemistry*. 62(11), 2421-2425.
- Reynolds, W. F., McLean, S., Poplawski, J., Enriquez, R. G., Escobar, L. I., León, I. (1986). "Total assignment of ^{13}C and ^1H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ^1H chemical shifts in structural investigations of complex natural products". *Tetrahedron*. 42(13), 3419-3428.
- Ríos-Castillo, T., Quijano, L., Reyes-Chilpa, R., (2012). Algunas reflexiones actuales sobre la herbolaria prehispánica desde el punto de vista químico. *Revista Latinoamericana de Química*. 40, 41-64.
- Robles-Zepeda, R. E., Molina-Torres, J., Lozoya-Gloria, E., López, M. G. (2006) "Volatile organic compounds of leaves and flowers of *Montanoa tomentosa*". *Flavour and Fragrance Journal*. 21(2), 225-227.

- Rogerio, A.P., Kanashiro, A., Fontanari, C. (2007). "Anti - inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma". *Inflammation Research*. 56, 402-408.
- Sánchez, T., Moreno, J. J. (1999). "Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin". *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 57(2-3), 119-131.
- Sánchez-Burgosa, J. A., Ramírez-Mares, M. V., Gallegos-Infante, J. A., González Laredo, R. F., Moreno-Jiménez M. R., Cháirez-Ramírez, M. H., Medina-Torres, L., Rocha-Guzmán, N. E. (2015). "Isolation of lupeol from white oak leaves and its anti-inflammatory activity". *Industrial Crops & Products*. 77, 827-832.
- Smith, J.B., Smith III, E.F., Lefer, A.M., Nicolau, K.C. (1981). "Spasmogenic effects of the anti-fertility agent – Zoapatanol". *Life Sciences Journal*. 28, 2743-2746.
- Sollozo-Dupont, I., Estrada-Camarena, E., Carro-Juárez, M., López-Rubalcava, C. (2015). "GABAA/benzodiazepine receptor complex mediates the anxiolytic-like effect of *Montanoa tomentosa*". *Journal of Ethnopharmacology*. 162, 278-286.
- Suárez, A. I., Chavez, K., Blanco, Z., Compagnone, R. S., Tillett, S., Torrico, F. (2013). "Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela". *Revista Latinoamericana de Química*. 41(3), 161-170.
- Sun, C. R., Shi, H., Pan, Y. J. (2002). "The natural diterpenoid kamebanin". *Act Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*. 58(6), o323-o324.
- Valerio, M., Awad, A. B. (2011). "β-Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages". *International Immunopharmacology*. 11, 1012-1017.
- Vazquez, M.B., Martinez, C.B., Aliphath, F.M., Aguilar, C.A. (2011). "Uso y conocimiento de plantas medicinales por hombres y mujeres en dos localidades indígenas en Coyomeapan, Puebla, México", *Inter ciencia*. 36 (7), 493-499.
- Villa Ruano, N. (2013). "Distintivos del zoapatle mexicano y su metabolismo secundario". *Temas de ciencia y tecnología*. 17, 3-9.
- Villa-De La Torre, F., Puebla-Pérez, A. M., Arana-Argaez, V. E., Ortiz-Andrade, R., Carballo-Uicab, G., Méndez-González, M., Borges-Argáez, R. (2017). "Anti-

inflammatory activity of *Critonia aromatisans* and *Montanoa grandiflora* leaves extracts, plants used in mayan traditional medicine to treat inflammation". *Polibotánica*. (43), 285-319.

- Wang, H. Q., Kim, M. P., Tiano, H. F., Langenbach, R., & Smart, R. C. (2001). "Protein kinase C- α coordinately regulates cytosolic phospholipase A2 activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanisms in mouse keratinocytes". *Molecular Pharmacology*. 59(4), 860-866.
- Wang, Y., Li, G. H., Liu, X. Y., Xu, L., Wang, S. S., Zhang, X. M. (2016). "In vivo anti-inflammatory effects of taraxasterol against animal models. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*". *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 14(1), 43-51.
- Xiong, H., Cheng, Y., Zhang, X., Zhang, X. (2014). "Effects of taraxasterol on iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW 264.7 macrophages". *Journal of Ethnopharmacology*. 155(1), 753-757.
- Zamilpa, A., Tortoriello, J., Navarro, V., Delgado, G., Álvarez, L. (2002). "Antispasmodic and antimicrobial diterpenic acids from *Viguiera hypargyrea* roots". *Planta Medica*. 68, 281-283.
- Zhang, X., Xiong, H., Liu, L. (2012). "Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages". *Journal of Ethnopharmacology*. 141(1), 206-211.